

JESSICA ALEXANDRA DA SILVA

**ANÁLISE DOS ISÓTOPOS ESTÁVEIS NA CARACTERIZAÇÃO E
RASTREABILIDADE DA MADEIRA DE *Eucalyptus grandis***

Botucatu

2021

JESSICA ALEXANDRA DA SILVA

**ANÁLISE DOS ISÓTOPOS ESTÁVEIS NA CARACTERIZAÇÃO E
RASTREABILIDADE DA MADEIRA DE *Eucalyptus grandis***

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia - Energia na Agricultura.

Orientador: Prof. Dr. Vladimir Eliodoro Costa

Botucatu

2021

S586a

Silva, Jessica Alexandra da

Análise dos isótopos estáveis na caracterização e rastreabilidade da madeira de *Eucalyptus grandis* / Jessica Alexandra da Silva. -- Botucatu, 2021

56 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu

Orientador: Vladimir Eliodoro Costa

1. *Eucalyptus grandis*. 2. Isótopos estáveis. 3. Madeira. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ANÁLISE DOS ISÓTOPOS ESTÁVEIS NA CARACTERIZAÇÃO E RASTREABILIDADE DA MADEIRA DE *Eucalyptus grandis*


AUTORA: JÉSSICA ALEXANDRA DA SILVA

ORIENTADOR: VLADIMIR ELIODORO COSTA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA (ENERGIA NA AGRICULTURA), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. VLADIMIR ELIODORO COSTA (Participação Virtual)
Biofísica e Farmacologia / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP

Prof. Dr. ALEXANDRE DAL PAI (Participação Virtual) 
Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu - UNESP

Dr.^a JULIANA CELIA DENADAI (Participação Virtual) 
Botucatu/SP / .

Botucatu, 08 de abril de 2021

*A meu querido esposo Anderson e aos meus queridos pais,
pelo apoio incondicional essencial para que eu
obtivesse essa conquista...*

*Obrigada, por sempre acreditarem e investirem
na minha formação...*

dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por essa experiência maravilhosa e engrandecedora.

Ao Prof. Dr. Vladimir Eliodoro Costa, pelo acolhimento, orientação, ensinamentos, incentivo e paciência, exemplo de professor e pessoa.

À toda equipe do Centro de Isótopos Estáveis (CIE), pela colaboração durante todo o período de realização do mestrado, meus sinceros agradecimentos a cada um do grupo pela amizade, companheirismo, apoio e paciência.

À Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA), pela oportunidade de participar do curso de pós-graduação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O gênero *Eucalyptus* destaca-se no meio comercial de reflorestamento devido ao alto rendimento madeira e facilidade de adaptação de suas espécies a diferentes climas e regiões. Contudo, pesquisas relacionadas à análise de isotópica aplicadas em madeira de reflorestamento são raras para espécies plantadas no Brasil. Dentre elas, o *Eucalyptus grandis* é uma das espécies mais cultivadas e possui elevada importância econômica, podendo ser encontrada nas formas seminal e clone. As análises de isótopos estáveis (AIE) são amplamente utilizadas na identificação da origem geográfica e também na detecção de adulterações em diversos produtos agrícolas. De modo similar, as relações isotópicas estáveis de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ em madeira - principalmente em espécies nativas - são vastamente empregadas em estudos climáticos e cronológicos. Entretanto, um dos maiores problemas encontrados na AIE em madeira está na dificuldade de se realizar a amostragem de forma que represente a variação isotópica na árvore inteira, sem a necessidade de cortá-la. Assim, este trabalho avaliou a variação dos valores isotópicos $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ na madeira de clones de árvores de *E. grandis* com intuito de otimizar a amostragem e a análise isotópica. Nesse sentido, os valores de $\delta^{13}\text{C}$ foram determinados por duas técnicas de obtenção da fase gasosa da amostra, combustão e conversão em alta temperatura, a fim de comparar-se os resultados obtidos entre elas. Conjuntamente, foi demonstrada a variação isotópica dentro de cada árvore e entre árvores, bem como a variação dos isótopos no sentido radial dos discos amostrados. Por fim, os resultados de $\delta^{13}\text{C}$ realizadas nas duas técnicas demonstraram alta concordância entre os valores. Enquanto que, a variação radial de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^2\text{H}$ demonstraram moderadas oscilações entre os pontos, principalmente nos discos a 12,5%, 37,5% e 62,5% em relação à altura das árvores. Esse comportamento não foi observado para o $\delta^{18}\text{O}$ que não demonstrou tendência padrão dos pontos no sentido radial conforme notado nos resultados de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^2\text{H}$. Ainda assim, conforme demonstrado neste trabalho as amostragens em espécies de *E. grandis* podem ser realizadas extraindo-se amostras sem a derrubada das árvores.

Palavras-chave: *Eucalyptus grandis*; Isótopos estáveis; Madeira.

ABSTRACT

The genus *Eucalyptus* stands out in the commercial medium of reforestation due to the high wood yield and the ease of adaptation of its species to different climates and regions. However, research related to the analysis of isotope applied to reforestation wood is rare for species planted in Brazil. Among them, *Eucalyptus grandis* is one of the most cultivated species and has high economic importance, and can be found in seminal and clone forms. The stable isotope analyzes (SIA) are widely used in the identification of geographical origin and also in the detection of adulterations in several agricultural products. Similarly, the stable isotopic relationships of $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^2\text{H}$ in wood - mainly in native species - are widely used in climatic and chronological studies. However, one of the biggest problems found in the SIA in wood is the difficulty of carrying out a sampling in a way that represents the isotopic variation in the entire tree, without the need to cut it. Thus, this work evaluated the isotopic variation of values $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^2\text{H}$ in the wood of *E. grandis* tree clones in order to optimize the sampling and isotopic analysis. In this sense, the $\delta^{13}\text{C}$ values were determined by two techniques for obtaining the gas phase of the sample, combustion and conversion at high temperature, in order to compare the results obtained between them. Together, the isotopic variation within each tree and between trees was demonstrated, as well as the variation of the isotopes in the radial direction of the sampled discs. Finally, the results of $\delta^{13}\text{C}$ performed in the two techniques demonstrated high agreement between the values. Whereas, the radial variation of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^2\text{H}$ showed moderate oscillations between the points, mainly in the discs at 12.5%, 37.5% and 62.5% in relation to the height of the trees. This behavior was not observed for $\delta^{18}\text{O}$ which is not a standard pattern of points not radial sense as noted in the results for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^2\text{H}$. Even so, as determined in this work, sampling in *E. grandis* species can be performed by extracting not the felling of the trees.

Keywords: *Eucalyptus grandis*; stables isotopes; cellulose.

LISTA DE SÍMBOLOS

$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	Razão isotópica dos isótopos estáveis do elemento carbono
$\delta^{13}\text{C}$	Diferença relativa da $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$
$^2\text{H}/^1\text{H}$	Razão isotópica dos isótopos estáveis do elemento hidrogênio
$\delta^2\text{H}$	Diferença relativa da $^2\text{H}/^1\text{H}$
$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	Razão isotópica dos isótopos estáveis do elemento oxigênio
$\delta^{16}\text{O}$	Diferença relativa da $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$
CHON	Carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio
AIE	Análise dos Isótopos Estáveis
EA	Analisador Elementar por combustão da amostra
HTC	Analisador Elementar por Conversão em Alta Temperatura da amostra
IRMS	Espectrômetro de Massa de Razão Isotópica
CF-IRMS	Espectrometria de Massa de Razão Isotópica por Fluxo Contínuo
mUr	Unidade de medida isotópica, mili Urey

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	Eucalipto e subprodutos.....	21
2.2	Certificação da madeira.....	22
2.3	Análises isotópicas em madeira.....	23
2.4	Análises isotópicas em celulose.....	26
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1	Amostragem da madeira.....	30
3.2	Preparação das amostras.....	31
3.3	Análise isotópica.....	32
3.4	Análise de dados.....	34
4	RESULTADOS.....	36
5	DISCUSSÃO.....	47
6	CONCLUSÕES.....	51
	REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* destaca-se no meio comercial, devido à alta produtividade de madeira, resultante do rápido crescimento de suas árvores e facilidade de adaptação a diferentes climas e regiões. A madeira gerada possui um grande potencial econômico, propiciado pela sua versatilidade de uso no mercado (serraria, laminação, geração de energia, papel, celulose e medicamentos) que favorecem os setores florestais e também várias comunidades rurais (EMBRAPA, 2019).

Destarte, o *Eucalyptus grandis* é uma das espécies mais cultivadas em reflorestamentos comerciais nas formas seminal e clone. No território brasileiro, estão plantados 5,5 milhões de hectares desse gênero, o que produz em média 41 m³ de madeira por hectare, em ciclos de corte de aproximadamente sete anos (EMBRAPA, 2020).

O aumento do investimento comercial em madeira de reflorestamento, gerou o interesse dos produtores pelo processo de certificação florestal. Essa etapa é um diferencial de sustentabilidade que atrai os mercados consumidores, pois garante que o manejo florestal seguiu princípios e critérios de responsabilidade social, ambiental e econômica. Além dessas vantagens, a certificação garante que a madeira não é proveniente de comércio ilegal (BVRIO, 2016).

Existem métodos de identificação e detecção da proveniência geográfica de produtos feitos de madeira que são usados como ferramentas úteis na luta contra a extração e o comércio ilegal dessa matéria prima. Atualmente, a originalidade da madeira tem sido detectada por impressão digital de DNA e dendrocronologia (GORI; STRADIOTTI; CAMIN, 2018; HANECA *et al.*, 2005).

O método de impressão digital de DNA baseia-se na análise do DNA de microrganismos presentes na madeira, admitindo-se que estes sejam específicos para determinada área geográfica (EL SHEIKHA *et al.*, 2013). Uma das maiores limitações deste método está na preservação da qualidade da amostra que geralmente é extraída da madeira e dificulta o sequenciamento dos fragmentos associados com as regiões informativas no código de barras do DNA (DORMONTT *et al.*, 2015).

A dendrocronologia é o estudo de anéis anuais em árvores e tem sido amplamente utilizada para determinar a origem de diversos produtos, como móveis antigos, madeira de naufrágios e barris de vinho (HAJJ *et al.*, 2017). Esse método promove de forma rápida e econômica a datação e origem da madeira usando larguras de anéis de árvores. Porém, possui limitações quanto às semelhanças de largura do anel e outros interferentes biológicos que afetam a comprovação do rastreio de algumas madeiras (BRIDGE, 2012).

A falta de métodos forenses disponíveis para detecção e o processamento de madeira ilegal dificulta a determinação da origem geográfica da madeira. Esse tipo de análise possui elevada importância para o combate do comércio ilegal, mas também para certificar comércios que estão sob conformidade legal. A certificação garante qualidade ao consumidor e pode influenciar também no comércio internacional (MEIER-AUGENSTEIN, 2019).

Por outro lado, a análise dos isótopos estáveis de carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e enxofre (CHONS) são usados no controle de alimentos para detecção de adulterações desde 1975 e revelou-se um método promissor na autenticidade e procedência geográfica de plantas e animais, bem como, seus subprodutos como leite, mel, vinho, sucos naturais, café, queijo, carne e azeite

(BONTEMPO *et al.*, 2019; FABERI *et al.*, 2018; GRIBOFF *et al.*, 2019; KAMILOGLU, 2019; KAWASHIMA; SUTO; SUTO, 2019; MATOS; JACKSON, 2019).

No entanto, para a determinação da procedência geográfica da madeira utilizando a análise dos isótopos estáveis de CHO é necessário avaliar-se a variação dos valores isotópicos $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ dentro da árvore e entre árvores. A magnitude desta variação pode simplificar a amostragem na árvore considerando o grande volume de madeira de uma árvore em comparação com outras plantas.

A análise isotópica de carbono é realizada em analisador elementar (EA) acoplado a um espectrômetro de massa de razão isotópica (IRMS). Convencionalmente, utiliza-se o EA por combustão em análise de carbono. Enquanto que, às análises de oxigênio e hidrogênio têm seus valores isotópicos determinados em EA por conversão em alta temperatura (HTC) da amostra acoplado a um IRMS. Porém, a possibilidade de analisar-se CHO simultaneamente tornaria a fase de amostragem mais simplificada e, dessa forma, reduziria os custos e tempo de preparo de amostra.

Outro ponto a ser abordado, é a variação isotópica de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ no sentido radial dos discos das árvores. Nota-se que, árvores de reflorestamento possuem melhor formação dos anéis anuais de crescimento. Em contrapartida, árvores nativas podem não apresentar um padrão nesses anéis. Nesse sentido, apesar da padronagem exibida nos anéis das árvores comerciais, as análises dos isótopos estáveis devem explorar toda a região do disco, a fim de identificar padrões importantes do comportamento das espécies em suas respectivas regiões.

Este trabalho tem como objetivo avaliar a variação dos valores isotópicos $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ na madeira de clones de árvores de *Eucalyptus grandis* com intuito de otimizar a amostragem e a análise isotópica. Desse modo, foram realizadas análises

isotópicas para carbono comparativa entre duas técnicas analíticas. Também foram avaliadas a variação isotópica dentro e entre árvores, bem como a variação dos isótopos no sentido radial dos discos amostrados nas árvores.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Eucalipto e seus subprodutos

O Brasil possui a segunda maior área florestal do mundo, perdendo apenas para a Rússia. Estima-se que 485,8 milhões de hectares pertencem a florestas nativas e, aproximadamente, 10 milhões de hectares são áreas de reflorestamento, principalmente de pinus e eucalipto (SNIF, 2018). A madeira proveniente desta espécie é utilizada como matéria prima para a produção de diversos produtos como: chapas de MDF e MDP, celulose, carvão e lenha.

Mormente, o interesse comercial pela celulose e papel, principalmente pelo mercado internacional, faz com que esses produtos representem 36% dos subprodutos de árvores plantadas no Brasil. Enquanto que, 12% da área plantada é direcionado para o segmento de siderurgia a carvão vegetal (IBÁ, 2019). Devido à importância da madeira e de seus derivados, a preocupação com o suprimento futuro incentivou o interesse industrial por florestas plantadas, que estão constantemente em crescimento e são consideradas importantes para fatores econômicos, ambientais e sociais (PAYN *et al.*, 2015).

O Brasil é um dos maiores exportadores mundiais de celulose, atrás apenas dos Estados Unidos da América (EUA). Em 2018, foram produzidos 21,1 milhões de toneladas de celulose, que representam o crescimento de 8,0% quando comparado ao ano de 2017. Assim sendo, foram exportados 14,7 milhões de toneladas, em contraste com o mercado interno que consumiu 6,5 milhões de toneladas desse produto (IBÁ, 2019).

No momento atual, o setor florestal corresponde aproximadamente 3,5% do Produto Interno Bruto (PIB) do Brasil, gerando o equivalente a US\$ 37,3 bilhões para o país. Por conseguinte, a celulose é responsável por US\$ 4 bilhões dessa rentabilidade (SNIF, 2020). Em todo o território nacional, podem ser encontradas florestas compostas por diversas espécies do gênero *Eucalyptus*, plantadas principalmente para fins comerciais. Visto que, a região Sudeste destaca-se dentre as demais regiões com cerca de 54,2% de áreas de plantio, seguida pelas regiões Nordeste (16,4%) e Centro-Oeste (12,2%) (EMBRAPA, 2019).

2.2 Certificação da madeira

A certificação da madeira plantada é um processo que vem crescendo e visa o controle de produção, evitando a prática da extração ilegal. O controle florestal é realizado pelo Programa Brasileiro de Certificação Florestal – Cerflor (SNIF, 2018). No Brasil, a fiscalização do comércio de madeira é realizada por agências ambientais federais e estaduais que reduzem o potencial de exploração ilegal. Entretanto, o comércio ilícito ainda permanece e a utilização de um método analítico que forneça informações sobre a sua originalidade, desempenhará um papel de ferramenta de proteção e certificação, que evitará prejuízo econômico e também desmatamento florestal (BVRIO, 2016).

Em 2018, a área de florestas plantadas com certificação FSC ou CEFLOR/PEFC aumentou em 9,5% em relação ao ano anterior (IBÁ, 2019). No Brasil, foram contabilizados 3,5 milhões de hectares certificados em manejo florestal de área de árvores plantadas em 2018, excluindo área produtiva, áreas de conservação e

áreas destinadas a outros empreendimentos que se considerados totalizam 6,3 milhões de hectares certificados (IBÁ, 2019).

2.3 Análises isotópicas em madeira

A partir das análises dos isótopos estáveis presentes nos anéis anuais das árvores é possível extrair diversas informações confiáveis e importantes sobre a influência de fatores externos no seu crescimento. Por exemplo, a presença humana nos locais de cultivo e plantação – aglomerados em casas e prédios –, pode influenciar no crescimento e no desenvolvimento das árvores, assim como a ação do manejo e a topografia da região (Caetano-Andrade 2020).

O primeiro estudo a aplicar dendrocronologia, anatomia da madeira e análise isotópica foi realizado em uma região do México, e sua metodologia contribui para estudos que buscam a caracterização do funcionamento *in situ* das árvores, bem como o uso de água durante o crescimento, e melhoramento do manejo florestal relacionado a mudanças climáticas (PACHECO *et al.*, 2020).

Uma abordagem integradora combinando informações climáticas remotas, frações de isótopos estáveis na madeira, séries temporais de anéis e a produtividade de árvores foi realizada para a espécie *Pinus hartwegii* Lindl. Essa integralização de processos forneceu o entendimento da influência do desempenho fisiológico das árvores e da topografia local. Este trabalho obteve resultados promissores para estudos que relacionam o carbono do ecossistema ao ciclo da água (CORREA-DÍAZ *et al.*, 2020).

Recentemente, a análise dos isótopos estável (AIE) ^{18}O e ^2H na madeira da espécie *Picea abies* – nativa nos alpes europeus – revelou forte dependência quanto

a fatores climáticos e ambientais, que estão diretamente relacionados com a localização geográfica das espécies. Assim, com os resultados obtidos foram criados modelos espaciais que relacionaram parâmetros de altitude, cobertura do dossel, radiação solar e temperatura de verão para a construção de mapas de paisagens isotópicas, conhecidos como “*isoscape*”. Estas *isoscapes* podem ser utilizadas para a rastreabilidade de madeira e, no trabalho em questão, objetivaram utilizá-la no combate ao comércio ilegal na região (GORI; STRADIOTTI; CAMIN, 2018; HURLEY; WEST; EHLERINGER, 2010).

Os isótopos de carbono estáveis podem ser utilizados na distinção da seca dentre outros fatores ambientais que influenciam na largura do anel e na conservação da floresta. Por exemplo, Schook e colaboradores (2020) investigaram a influência da seca hidrológica no crescimento e morte de algodoeiros ribeirinhos (*Populus angustifolia* e *P. angustifolia* x *P. trichocarpa*) ao longo de Snake Creek em Nevada, EUA. Analisando árvores em escalas anuais a meio século, constataram que a escassez da água provocou redução da assimilação de carbono e do crescimento basal e também afetou a sobrevivência das espécies. Esses declínios foram causados pela limitação da fotossíntese e puderam ser observados apenas décadas depois. Estes resultados tornaram-se ferramentas preditivas importantes, principalmente para manejadores florestais (SCHOOK *et al.*, 2020).

Em estudo recente, foi observada a discriminação isotópica de carbono em anéis de espécies de árvores (coníferas claras e escuras) representativas de determinada região da Sibéria Ocidental para analisar respostas fisiológicas a longo prazo. Desse modo, a principal hipótese foi de que as espécies expostas à seca (escuras) possuem maior capacidade de resposta ao ^{13}C , pois refletem o uso conservador de água. Porém, concluíram que a ideia anterior deveria ser descartada,

pois os resultados demonstraram que não houve diferença estatística entre as coníferas. Contudo, seus resultados forneceram informações fisiológicas importantes e detalhadas sobre a influência da seca na região estudada (VOLTAS *et al.*, 2020).

Os isótopos estáveis ^{13}C e ^{18}O presentes nos anéis anuais de madeira fornecem informações fisiológicas das árvores quanto às condições ambientais e climas passados, e são amplamente utilizadas em estudos fisiológicos, ecológicos e paleoclimáticos. Assim, um dispositivo de alto rendimento para a extração de celulose a partir de pequenas quantidades de madeira inteira e a análise simultânea dos isótopos ^{13}C e ^{18}O foi construído objetivando a otimização das amostragens e das AIE. Essa proposta promissora, tornou-se um meio de contenção de gastos e redução do tempo destinado às extrações de celulose e das análises isotópicas na madeira (ANDREU-HAYLES *et al.*, 2019).

Do mesmo modo, análises simultâneas em isótopos de ^{13}C e ^{18}O podem ser muito úteis para pesquisas baseadas na identificação de variações climáticas sazonais em árvores tropicais (Caetano-Andrade 2020). Em consequente, estudo relacionado ao clima e manejo demonstrou como ambos influenciam a variação dos isótopos de oxigênio e carbono nos anéis de árvores da floresta amazônica. Seus resultados demonstraram padrões intra-anuais distintos para estes isótopos analisados nos anéis de espécies plantadas em terra firme e em várzea (CINTRA *et al.*, 2019).

É evidente que, árvores são excelentes arquivos climáticos para a construção de mapas geográficos, por serem precisamente datáveis. Nesse sentido, o ^{18}O é considerado um parâmetro de confiança para a grande escala de mapeamento de variações passadas de ^{18}O em precipitação (SAURER *et al.*, 2002; SHI *et al.*, 2019). Em análises isotópicas, a identificação da proveniência geográfica dentro da madeira

é fornecida por fitoquímicos que ao serem sintetizados, incorporaram isótopos estáveis específicos disponíveis no ambiente circundante, que variam conforme o clima e a geologia do local de origem (DORMONTT *et al.*, 2015).

Ao analisar a composição isotópica de oxigênio em amostras de madeira é possível, dessa maneira, promover o controle de origem do material. Além disso, esse procedimento pode ser realizado para todos os gêneros arbóreos (HORACEK; JAKUSCH; KREHAN, 2009).

A variabilidade espacial na composição isotópica de hidrogênio e oxigênio foi estudada para árvores da espécie *Pinus densiflora*. Desse modo, os resultados comprovaram que o isótopo de ^2H classificou a origem geográfica melhor que o isótopo de ^{18}O , em termos de significância estatística, para a espécie em questão. Apesar das diferenças relacionadas à variação isotópica entre as espécies, é certo que a AIE é uma ferramenta útil para a identificação da proveniência geográfica de madeira (LEE *et al.*, 2015).

2.4 Análises isotópicas em celulose

A holocelulose é um polímero linear composto por celulose nas formas α , β e γ e hemicelulose. A α -celulose é muito usada para análise de isótopos de carbono e oxigênio. A análise de hidrogênio exige mais cautela, pois o hidrogênio presente nos grupos hidroxila da estrutura da α -celulose troca átomos de hidrogênio com a água e estes, devem ser considerados nas análises para que sejam incluídos apenas hidrogênios estruturais, estabelecidos no momento de formação da celulose (COOK *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2020).

Estruturalmente, a celulose é um polímero linear de cadeia longa formado por moléculas de glicose que são ligadas entre si por ligações β - 1,4 - glicosídicas (MORAIS; SANSÍGOLO; NETO, 2016). Possui curta rota de síntese, composição química singular e imobilidade física no interior do caule (SCHOLLAEN *et al.*, 2017). Devido à essas características, torna-se o componente da madeira mais utilizado em análises isotópicas. Na forma de α -celulose possui estrutura altamente estável e de fácil homogeneização, livre de compostos móveis como resinas e ceras (ANDREU-HAYLES *et al.*, 2019).

As proporções das massas de celulose e lignina podem variar ao longo da árvore influenciando nas composições isotópicas da madeira (ANDREU-HAYLES *et al.*, 2019). A lignina possui quantidade superior de carbono absoluto se comparada a celulose e hemicelulose, representando assim a maior porção de carbono da madeira inteira (SCHOLLAEN *et al.*, 2017).

A extração da alfa-celulose de madeira ou outro material vegetal é um processo intensivo composto por várias etapas. Geralmente, na primeira etapa a madeira é seca e moída. Posteriormente, são utilizados solventes de diferentes polaridades para a remoção dos lipídeos. Por fim, a ligninas e outras proteínas são removidas por processos ácido-oxidativos (COOK *et al.*, 2017). Existem diferentes métodos de extração da celulose, sendo que as principais diferenças entre eles estão relacionadas ao tempo de preparo, solventes utilizados e rendimento final de celulose ou holocelulose.

A composição isotópica estável da celulose dos anéis das árvores fornece dados registrados referentes às condições da estação de crescimento das plantas e dessa forma, reflete respostas foliares incorporadas do dossel até fatores ambientais alterados por processos eco fisiológicos (VOELKER *et al.*, 2019). Dentre os

componentes da madeira a α -celulose é sempre escolhida para a análise isotópica, principalmente para ^{18}O , pois preserva informações desde o momento da formação sem sofrer trocas isotópicas posteriores, enquanto que os outros componentes podem exprimir diferentes períodos de síntese da árvore (LIU *et al.*, 2017; SARGEANT; SINGER; VALLET-COULOMB, 2019).

Os átomos de oxigênio presentes na celulose não sofrem fracionamento isotópico entre o início da sua absorção na água pelas raízes das árvores e seu transporte até às folhas. Essa água transportada até às folhas evapora e resulta em água foliar enriquecida em isótopos pesados (OKAZAKI; YOSHIMURA, 2019). O ^{18}O precipitado é considerado leve no inverno e pesado no verão, para climas temperados (SARGEANT; SINGER; VALLET-COULOMB, 2019).

Estudos mais atuais tem utilizado os valores isotópicos de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) da celulose extraída dos anéis das árvores como registros da eficiência do uso intrínseco da água que fornecem uma base direta e confiável principalmente para estudos paleoclimáticos (LILES *et al.*, 2019; RAO *et al.*, 2019).

Estudos recentes sugerem que a extração da celulose é desnecessária para a detecção de sinais climáticos em diversas regiões para determinadas espécies de árvores. Ainda mais, foi demonstrado que a remoção da lignina reduz a detecção climática de ^{13}C e ^{18}O para os anéis de crescimento (GUERRIERI *et al.*, 2017).

Os anéis anuais da madeira possuem fontes de carbono e os valores de $\delta^{13}\text{C}$ estão relacionados à fonte fotossintética usada pela planta, que neste contexto é tipicamente CO_2 atmosférico, enquanto que os valores de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ variam de acordo com a disponibilidade de água absorvida pelas raízes no solo (BOETTGER *et al.*, 2014; BOOTH *et al.*, 2010; OHASHI *et al.*, 2016; VAN DER SLEEN; ZUIDEMA; PONS, 2017).

Qualquer estresse ambiental provoca redução na condutância estomática e afeta diretamente a absorção de CO₂ durante a fotossíntese. Por isso, a restrição hídrica influencia pontualmente na eficiência da captação de carbono (LILES *et al.*, 2019). Nesse sentido, foi demonstrado que durante períodos curtos, os padrões de isótopos de carbono da madeira e celulose da espécie *Cariniana micranta* variaram entre si, possivelmente por mudanças ambientais que ocorreram durante o período estudado (SCHLESER *et al.*, 2015).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem da madeira

Foram utilizadas seis árvores de clones da espécie *Eucalyptus grandis* com cinco anos. As árvores foram cultivadas na Estação Experimental de Itatinga-SP, Brasil (23°020 S; 48°380 W) de 2010 a 2014, onde a precipitação média anual foi de 1578 mm/ano. Em cada árvore foram amostrados quatro discos com 2,0 cm de espessura cada – localizados no centro de cada ¼ da altura total –, e distribuídos nos percentuais de 12,5% (disco a), 37,5% (disco b), 62,5% (disco c) e 87,5% (disco d) da altura da árvore em ordem crescente, totalizando 24 discos com o valor dos raios mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Características dos 24 discos das 6 árvores amostradas da espécie *Eucalyptus grandis*. Em que o raio (r) está em mm, e o número de pontos amostrados em cada disco no sentido radial é representado por n. Os discos estão apresentados conforme percentuais das alturas das árvores: 12,5% (disco a), 37,5% (disco b), 62,5% (disco c) e 87,5% (disco d)

Disco	1		2		3		4		5		6	
	r	n	r	n	r	n	r	n	r	n	r	n
d	18,5	6	20,4	7	19,9	7	19,1	6	17,8	5	19,7	6
c	34,2	10	37,1	12	37,4	13	36,0	12	38,0	13	41,9	15
b	45,8	14	48,5	16	51,9	18	50,3	19	53,5	19	56,5	20
a	56,5	17	60,8	19	62,9	20	63,7	21	66,0	26	70,2	24
Soma	155,0	47	166,8	54	172,0	58	169,0	58	175,4	63	188,3	65

3.2 Preparação das amostras

As amostras foram extraídas ponto a ponto, em torno de 20 mg de madeira cada ponto, na direção radial dos discos no sentido centro-casca, conforme representado na Figura 1. A extração foi realizada por meio de uma broca de 2,0 mm de diâmetro, a aproximadamente 1 mm de distância entre os furos. A primeira camada de perfuração foi descartada, a fim de evitar possível contaminação oriunda da superfície do disco. Em seguida, extraiu-se a amostra com cerca de 10 mm de profundidade. Assim, o pó formado foi recolhido e colocado em um tubo de plástico (tipo Eppendorf) de 1,5 mL. Durante todo o procedimento, a broca foi esterilizada com álcool e a pulverulência do disco limpa. Foram amostrados um total de 345 pontos considerando todos os discos das seis árvores (Tabela 1).

Figura 1 - Extração das amostras de madeira na direção radial nos discos



Em seguida, as amostras foram secas em estufa à temperatura de 40°C por 72 horas e acondicionada num dessecador à vácuo conforme (QI; COPLEN; JORDAN, 2016). A secagem à vácuo lenta das amostras foi necessária para remover qualquer resíduo de água da amostra retido pela absorção da umidade ambiente. Após secas, as amostras foram colocadas em cápsulas de prata de 3,5 x 5,0 mm com alíquotas entre 200 a 250 µg utilizando-se uma balança analítica com resolução de 1 µg (XP6 – Mettler Toledo, EUA) em sala climatizada com umidade relativa mantida em torno de 40% para análise de ^{13}C , ^2H e ^{18}O . Enquanto que, para a análise isolada de ^{13}C – apenas uma árvore (árvore 5 com 63 amostras, Tabela 1) – foram pesadas todas as amostras em cápsulas de estanho de 3,5 x 5,0 mm com alíquotas de 80 a 120 µg.

3.3 Análise Isotópica

As análises isotópicas foram realizadas no Centro de Isótopos Estáveis “Prof. Dr. Carlos Ducatti” - CIE do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu-SP, por meio de dois sistemas de espectrometria de massa de razão isotópica por fluxo contínuo (CF-IRMS). Um constituído de um analisador elementar (EA) por combustão acoplado a um espectrômetro de massa de razão isotópica (IRMS). Outro de um EA por conversão em alta temperatura (HTC) acoplado a outro IRMS. Convencionalmente, utiliza-se o EA por combustão para análise de ^{13}C e ^{15}N , e o HTC para análise de ^2H e ^{18}O em madeira. Neste trabalho, foi realizada a análise de ^{13}C para a madeira utilizando-se ambas as técnicas EA e HTC. Essa comparação já foi testada e sua eficácia comprovada em análises de ^{13}C em celulose (ANDREU-HAYLES *et al.*, 2019; GEHRE; STRAUCH, 2003; KNÖLLER *et al.*, 2005). Desse modo, utilizamos o CF-IRMS com HTC (TC/EA, Thermo Científic, Alemanha)

de fluxo reverso acoplado a um IRMS (Delta V Advantage, Thermo Scientific, Alemanha) para análise simultânea de ^2H , ^{13}C e ^{18}O . Enquanto que para as análises de ^{13}C por combustão foi utilizado um CF-IRMS com EA (Flash EA, Thermo Scientific, Alemanha) acoplado a um IRMS (Delta V Advantage, Thermo Scientific, Alemanha).

No TC/EA as amostras foram colocadas em um amostrador automático (MAS 200R, Thermo Scientific, Alemanha) com purga de He a 100 ml/minuto que inseria uma de cada vez no reator à 1400°C, onde eram convertidas em H_2 , H_2O , CO e CO_2 . Os gases eram carregados até o IRMS por He (pureza de 99,9999%) com fluxo de 90 ml/minuto, passado por um filtro para retenção de H_2O e CO_2 antes de alcançar a coluna cromatográfica que separa o H_2 do CO . No IRMS foram determinadas as razões isotópicas $R(^2\text{H}/^1\text{H})$ no gás H_2 que chegou primeiro a partir da razão das massas 3/2 ($^2\text{HH}/\text{H}_2$), e depois, as razões isotópicas $R(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})$ e $R(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})$ no gás CO que chegou depois a partir da razão das massas 29/28 e 30/28 ($^{13}\text{CO}/\text{CO}$ e $\text{C}^{18}\text{O}/\text{CO}$) respectivamente. Os resultados foram expressos em δ , definido pela diferença relativa da razão isotópica da amostra a partir de uma razão isotópica de um padrão internacional VSMOW para $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ e VPDB para $\delta^{13}\text{C}$ conforme equação 1, onde E é o elemento, i o isótopo raro e j o isótopo abundante (COPLIN, 2011).

$$\delta^i E = \frac{R(^i E/^j E)_{amostra}}{R(^i E/^j E)_{padr\tilde{a}o}} - 1 \quad (1)$$

Os valores de $\delta^2\text{H}$, $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{18}\text{O}$ em mili Urey (mUr) (BRAND; COPLIN, 2012) foram normalizados por ancoragem de dois pontos (PAUL; SKRZYPEK; FÓRIZ, 2007) utilizando os padrões USGS54, USGS55 e USGS56 (QI; COPLIN; JORDAN, 2016) intercalados a cada 14 amostras. A incerteza padrão no TC/EA (n=10) foi de $\pm 0,9$ mUr, $\pm 0,19$ mUr e $\pm 0,44$ mUr para $\delta^2\text{H}$, $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{18}\text{O}$ respectivamente.

No Flash EA as amostras foram colocadas em um amostrador automático (MAS 200R, Thermo Scientific, Alemanha) com purga de He a 100 ml/minuto que inseriu as amostras no reator de maneira sequenciada a 1020 °C em conjunto com um pulso de 9,0 mL de O₂, onde ocorreu a combustão da amostra formando CO₂, N₂ e H₂O. Os gases eram carregados até IRMS por He (pureza de 99,9999%) com fluxo de 120 mL/minuto passado por um filtro para retenção de H₂O, e uma coluna cromatográfica que separa os gases N₂ do CO₂. No IRMS foi determinada apenas a razão isotópica $R(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})$ do CO₂ a partir da razão das massas 45/44 ($^{13}\text{CO}_2/\text{CO}_2$). Os resultados do também foram expressos em δ conforme equação 1. Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ foram normalizados por ancoragem do gás de referência CO₂ (pureza de 99,9999%) calibrado com o padrão NBS 22 e incerteza padrão de $\pm 0,08$ mUr para o $\delta^{13}\text{C}$ (n=10).

3.4 Análise dos dados

Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos pelas duas técnicas HTC e EA foram comparados a partir de regressão linear e sobreposição de pontos. Para cada um dos 24 discos foram calculadas as médias aritméticas, desvio padrão e amplitude dos pontos na direção radial. Também foram calculadas as médias ponderadas dos discos considerando que eles são formados por n anéis concêntricos de área (A_i), e valores de δ (δ_i) representados por cada ponto conforme equações 2 e 3.

$$\delta_{pond} = \frac{\delta_1 A_1 + \delta_2 A_2 + \delta_3 A_3 + \dots + \delta_n A_n}{A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n} \quad (2)$$

$$A_1 = r^2\pi$$

$$A_2 = 4r^2\pi - r^2\pi = 3r^2\pi$$

$$A_3 = 9r^2\pi - 4r^2\pi = 5r^2\pi \quad (3)$$

$$A_4 = 16r^2\pi - 9r^2\pi = 5r^2\pi$$

$$A_i = i^2r^2\pi - (i-1)r^2\pi = (2i-1)r^2\pi$$

Considerando que δ_i ao longo do raio dos discos foi determinada com aproximadamente mesmo intervalo de distância radial (r), assim r não depende da ponderação. Sabendo-se também que o termo $(2i-1)$ é a sequência dos números naturais ímpares, e que a soma deles é igual a n^2 , substituímos a equação 3 na 2 obtendo a equação 4 para média ponderada do disco.

$$\delta_{pond} = n^{-2} \sum_{i=1}^n (2i-1)\delta_i \quad (4)$$

Para cada árvore foi calculada a média aritmética dos pontos dos discos e a média ponderada da árvore a partir da área de cada disco conforme equação 2. Com intuito de encontrar a região de amostragem na árvore que representaria a média ponderada da árvore, também foi calculada a média aritmética da metade dos pontos até a casca (Média art. 1/2a) do “disco a” em 12,5% da altura para cada árvore.

Para avaliar a variação dos valores isotópicos na direção radial nos discos foram comparadas a média aritmética dos pontos com a média ponderada do disco. Para a avaliar a variação dos valores isotópicos na direção longitudinal nas árvores foram comparadas a média aritmética dos discos com a média ponderada da árvore.

4 RESULTADOS

Os valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ determinados por HTC e EA no CF-IRMS das 63 amostras de madeira da árvore 5 apresentaram valores muito semelhantes. A Figura 2 mostra alta concordância entre os valores de $\delta^{13}\text{C}$ utilizando as duas técnicas analíticas nas mesmas amostras para determinação do valor de $\delta^{13}\text{C}$. A Figura 3 apresenta a comparação por sobreposição dos mesmos valores de $\delta^{13}\text{C}$ nas mesmas amostras.

Figura 2 – Correlação dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ de madeira inteira de *Eucalyptus grandis* determinados nas mesmas amostras por conversão em alta temperatura (HTC) e por combustão (EA)

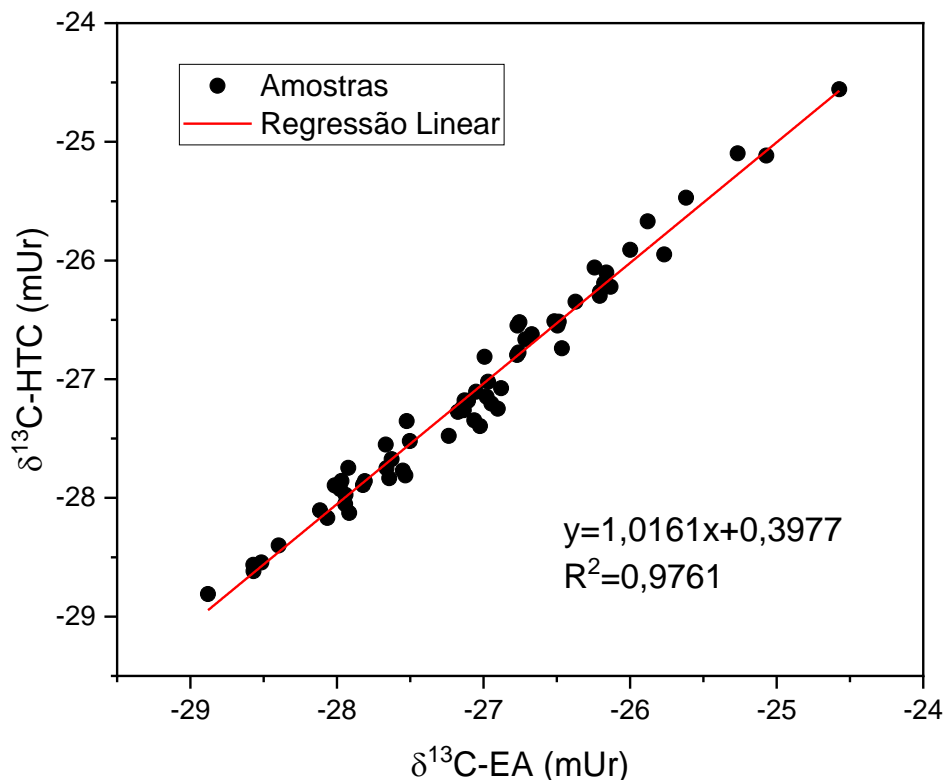
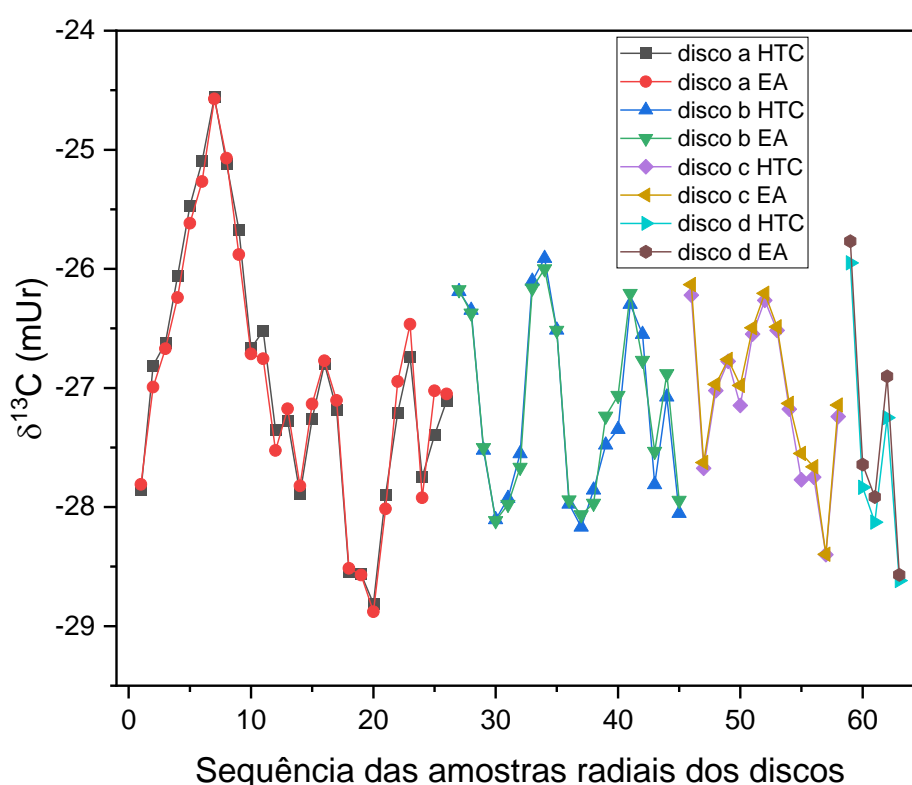


Figura 3 – Sobreposição dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ de madeira inteira de *Eucalyptus grandis* determinados nas mesmas amostras por conversão em alta temperatura (HTC) e por combustão (EA) em CF-IRMS. Amostras pontuais na direção radial, sentido centro-casca dos 4 discos da árvore nos percentuais da altura: disco a (12,5%); disco b (37,5%); disco c (62,5%) e disco d (87,5%)



A regressão linear dos pontos na Figura 2 apresentou coeficiente angular de 1,0161, evidenciando a alta correção entre as técnicas, também mostrada no alto valor de R^2 (0,9761). Em um trabalho anterior, foi encontrado coeficiente angular de 0,9993 e r^2 de 0,911 na comparação entre as mesmas técnicas para determinação do $\delta^{13}\text{C}$, mas utilizando amostras de celulose (KNÖLLER et al., 2005b). Na sobreposição dos

valores de $\delta^{13}\text{C}$, por ambas técnicas, ficou evidente a coincidência dos pontos apresentados na Figura 3.

A variação radial dos valores de $\delta^2\text{H}$ apresentados na Figura 4, mostra o aumento, quase imperceptível, no sentido centro casca para os discos a 37,5% e 12,5% da altura da árvore (Figuras 4C e 4D), em que todas as regressões lineares dos pontos tiveram coeficientes angulares positivos. Também é possível notar uma leve oscilação dos pontos nestes mesmos discos. No entanto, os discos a 62,5% e 87,5% da altura de todas as árvores não apresentaram tendência homogênea dos valores de $\delta^2\text{H}$, pois os coeficientes angulares das regressões foram muito próximos de zero (Figuras 4A e 4B).

A Tabela 2, apresenta os valores médios e a amplitude de variação para os valores de $\delta^2\text{H}$ com a média ponderada total de -91,7 mUr com amplitude de 73,4 mUr considerando todas as árvores. A variação das médias ponderadas entre as seis árvores foi de 9,4 mUr. Na direção longitudinal, os valores médios dos discos variaram entre -93,7 mUr (disco d) a -89,0 mUr (discos c) mostrando menor variação do que entre árvores. Para os discos "a" e "b", as médias ponderadas foram maiores que a média aritmética em 7,6 mUr e 4,6 mUr respectivamente, evidenciando o aumento dos valores no sentido centro-casca devido a maior contribuição na ponderação dos pontos próximos da casca. Os valores da média aritmética da metade dos pontos dos discos a, ficaram muito próximos da média ponderada da árvore, e mostraram que esta amostragem simplificada pode representar o valor médio da árvore.

Figura 4 – Variação radial dos valores de $\delta^2\text{H}$ (mUr) na madeira inteira de *E. grandis* de 6 árvores com 4 discos nos percentuais da altura: (A) 87,5%; (B) 62,5%; (C) 37,5%; (D) 12,5%

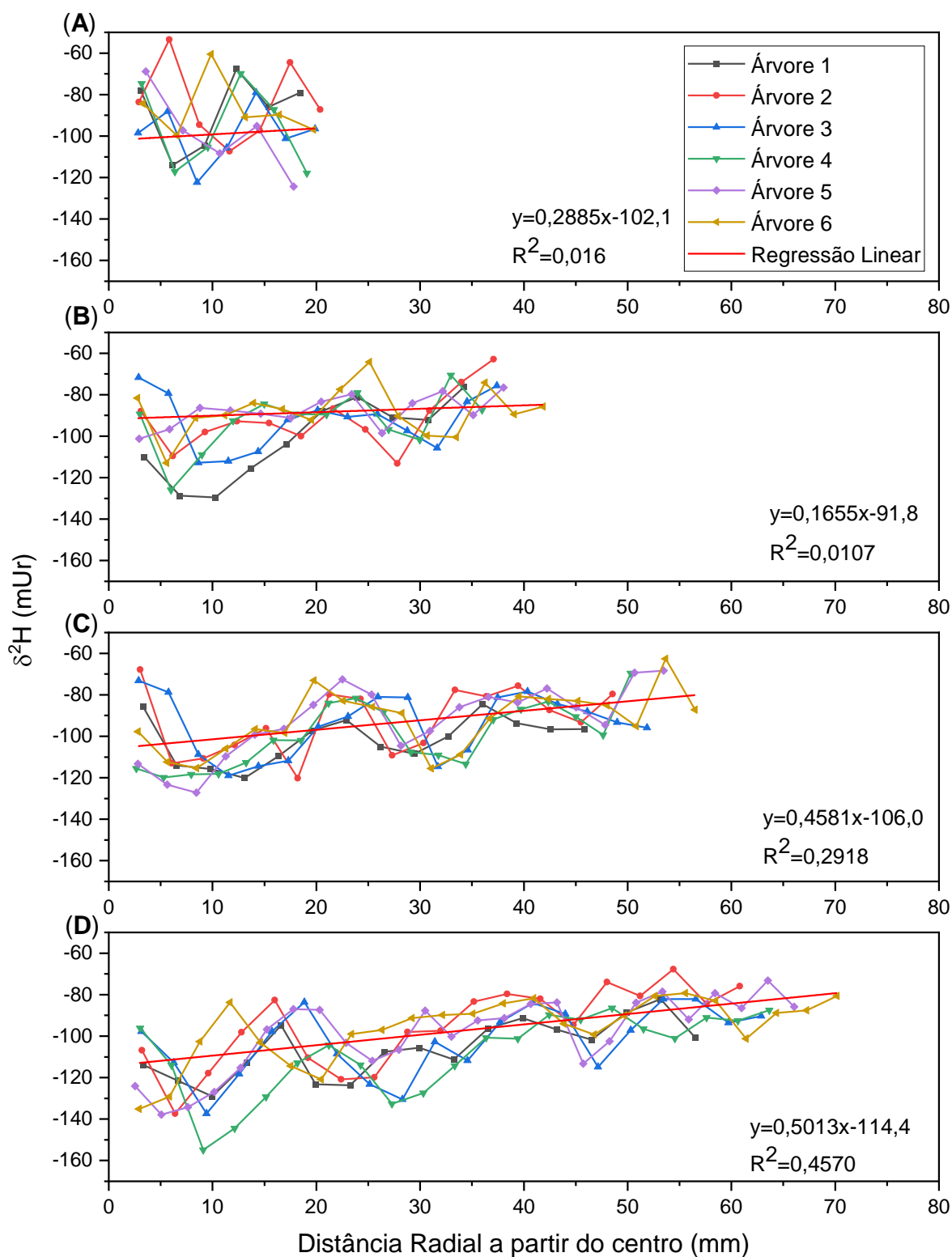


Tabela 2 – Valores médios de $\delta^2\text{H}$ (mUr) da madeira inteira de *E. grandis* de 6 árvores com 4 discos nos percentuais de altura 12,5%(a), 37,5(b), 62,5(c) e 87,5%(d)

		$\delta^2\text{H}$	$\delta^2\text{H}$	$\delta^2\text{H}$	$\delta^2\text{H}$	$\delta^2\text{H}$	$\delta^2\text{H}$	$\delta^2\text{H}$
disco	árvore	1	2	3	4	5	6	
<i>d</i>	<i>Média aritmética</i>	-88,2	-84,0	-98,8	-95,4	-98,8	-87,0	-92,0
	<i>Desvio padrão</i>	17,6	18,9	13,7	21,1	20,3	14,0	17,6
	<i>Amplitude</i>	46,3	53,9	43,4	48,0	55,4	39,2	47,7
	<i>Média ponderada</i>	-85,0	-85,5	-97,9	-97,9	-107,5	-88,8	-93,7
<i>c</i>	<i>Média aritmética</i>	-101,7	-91,9	-92,7	-93,0	-87,9	-88,1	-92,5
	<i>Desvio padrão</i>	18,9	13,9	13,6	14,4	7,7	11,6	13,3
	<i>Amplitude</i>	53,3	50,2	41,1	55,3	24,7	48,6	45,5
	<i>Média ponderada</i>	-92,9	-88,0	-91,9	-89,0	-85,3	-86,9	-89,0
<i>b</i>	<i>Média aritmética</i>	-101,4	-92,5	-94,3	-99,7	-92,4	-92,8	-95,5
	<i>Desvio padrão</i>	11,1	15,9	14,8	15,0	17,3	14,5	14,8
	<i>Amplitude</i>	35,7	52,4	45,8	50,3	58,8	52,8	49,3
	<i>Média ponderada</i>	-98,8	-89,4	-92,9	-93,9	-85,0	-84,5	-90,7
<i>a</i>	<i>Média aritmética</i>	-105,0	-95,3	-102,9	-108,7	-98,7	-96,1	-101,1
	<i>Desvio padrão</i>	13,4	19,1	16,9	19,4	17,8	15,3	17,0
	<i>Amplitude</i>	47,0	69,7	55,2	68,3	64,7	55,8	60,1
	<i>Média ponderada</i>	-99,0	-87,2	-90,2	-101,3	-91,1	-90,2	-93,2
<i>árvore</i>	<i>Média aritmética</i>	-101,0	-92,3	-97,3	-101,1	-94,6	-92,4	-96,4
	<i>Desvio padrão</i>	15,2	17,0	15,4	17,9	16,5	14,3	16,0
	<i>Amplitude</i>	61,9	83,9	65,6	85,3	69,4	74,5	73,4
	<i>Média art. 1/2a</i>	-96,1	-81,9	-97,7	-95,8	-88,2	-87,6	-91,2
	<i>Média ponderada</i>	-97,2	-87,9	-91,7	-97,0	-88,8	-87,8	-91,7

Figura 5 – Variação radial dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ (mUr) na madeira inteira de *E. grandis* de 6 árvores com 4 discos nos percentuais da altura: (A) 87,5%; (B) 62,5%; (C) 37,5%; (D) 12,5%

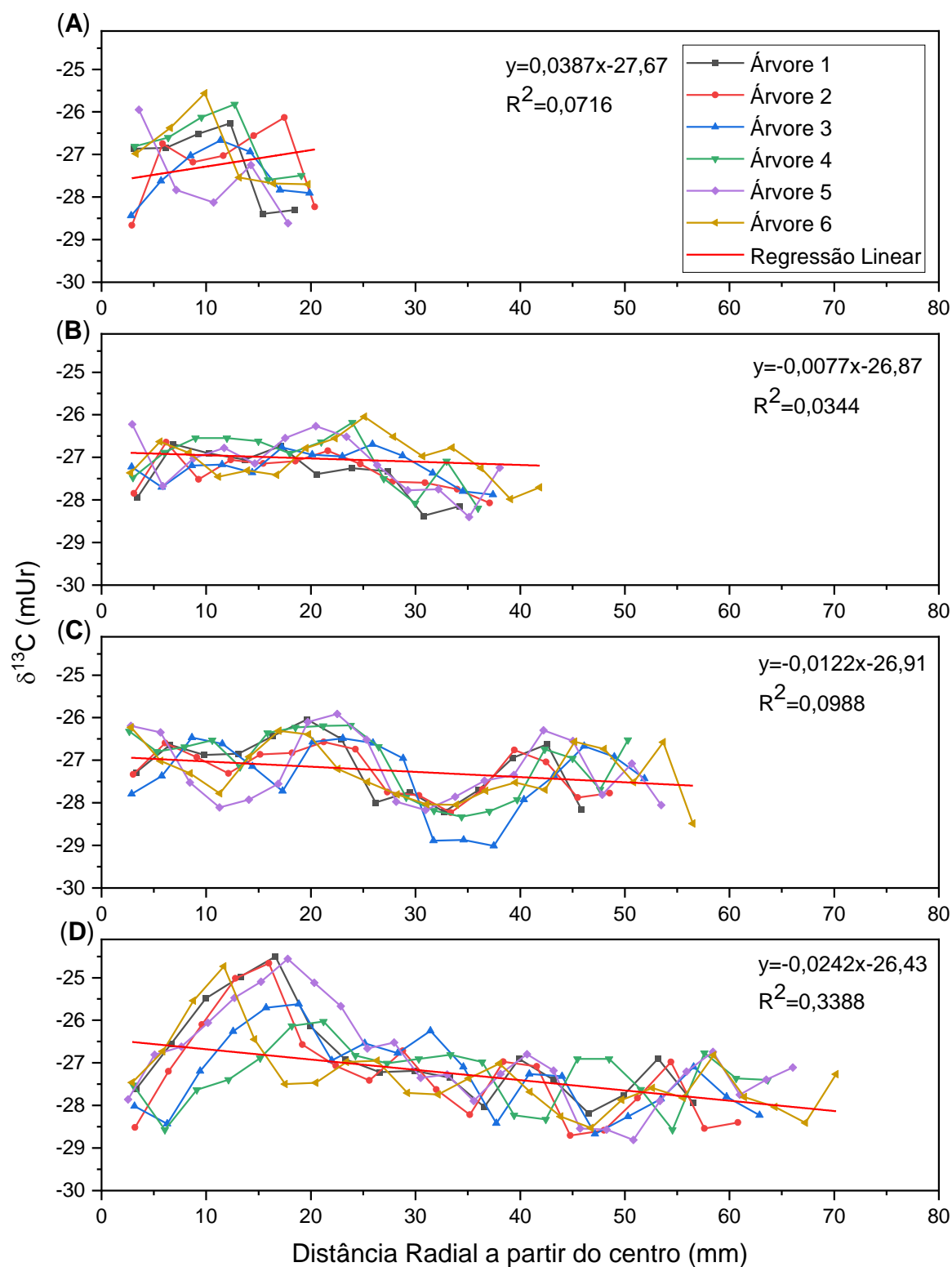


Tabela 3 – Valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ (mUr) da madeira inteira de *E. grandis* de 6 árvores com 4 discos nos percentuais de altura 12,5%(a), 37,5% (b), 62,5% (c) e 87,5%(d)

		$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$
disco	árvore	1	2	3	4	5	6	
d	<i>Média aritmética</i>	-27,20	-27,22	-27,49	-26,74	-27,56	-26,97	-27,20
	<i>Desvio padrão</i>	0,92	0,91	0,63	0,71	1,03	0,86	0,84
	<i>Amplitude</i>	2,13	2,53	1,77	1,77	2,67	2,13	2,17
	<i>Média ponderada</i>	-27,52	-27,09	-27,44	-26,91	-27,94	-27,24	-27,36
c	<i>Média aritmética</i>	-27,38	-27,11	-27,23	-27,05	-27,12	-27,04	-27,16
	<i>Desvio padrão</i>	0,59	0,90	0,38	0,63	0,65	0,51	0,61
	<i>Amplitude</i>	1,68	3,50	1,18	2,02	2,18	1,94	2,08
	<i>Média ponderada</i>	-27,55	-27,11	-27,27	-27,22	-27,30	-27,10	-27,26
b	<i>Média aritmética</i>	-27,14	-27,26	-27,38	-27,03	-27,20	-27,26	-27,21
	<i>Desvio padrão</i>	0,70	0,53	0,85	0,75	0,78	0,66	0,71
	<i>Amplitude</i>	2,18	1,66	2,55	2,15	2,26	2,26	2,18
	<i>Média ponderada</i>	-27,31	-27,40	-27,48	-27,22	-27,29	-26,21	-27,15
a	<i>Média aritmética</i>	-26,91	-27,27	-27,23	-27,28	-26,93	-27,32	-27,16
	<i>Desvio padrão</i>	1,09	1,15	0,91	0,71	1,10	0,86	0,97
	<i>Amplitude</i>	3,68	4,04	3,05	2,55	4,25	3,79	3,56
	<i>Média ponderada</i>	-26,96	-27,62	-25,30	-27,31	-27,27	-27,60	-27,01
árvore	<i>Média aritmética</i>	-27,12	-27,23	-27,31	-27,09	-27,10	-27,20	-27,18
	<i>Desvio padrão</i>	0,86	0,89	0,75	0,71	0,92	0,73	0,81
	<i>Amplitude</i>	3,89	4,13	3,40	2,75	4,25	3,79	3,70
	<i>Média art. 1/2a</i>	-27,56	-27,89	-27,52	-27,45	-27,63	-27,76	-27,63
	<i>Média ponderada</i>	-27,20	-27,44	-26,42	-27,25	-27,30	-27,07	-27,11

Figura 6 – Variação radial dos valores de $\delta^{18}\text{O}$ (mUr) na madeira inteira de *E. grandis* de 6 árvores com 4 discos nos percentuais da altura: (A) 87,5%; (B) 62,5%; (C) 37,5%; (D) 12,5%

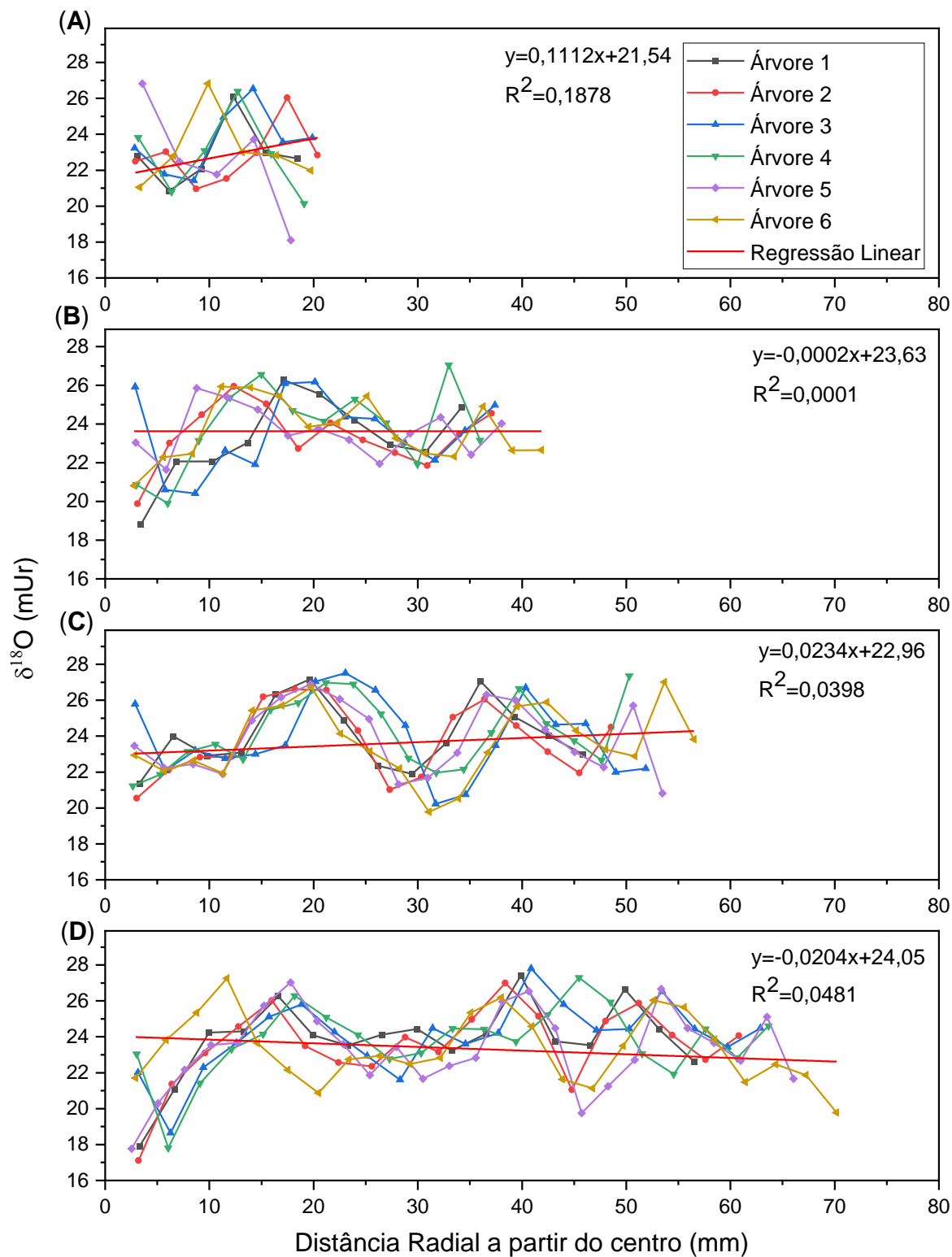


Tabela 4 – Valores médios de $\delta^{18}\text{O}$ (mUr) da madeira inteira de *E. grandis* de 6 árvores com 4 discos nos percentuais de altura 12,5%(a), 37,5% (b), 62,5% (c) e 87,5%(d)

		$\delta^{18}\text{O}$	$\delta^{18}\text{O}$	$\delta^{18}\text{O}$	$\delta^{18}\text{O}$	$\delta^{18}\text{O}$	$\delta^{18}\text{O}$	$\delta^{18}\text{O}$
disco	árvore	1	2	3	4	5	6	
d	<i>Média aritmética</i>	22,91	22,84	23,61	22,86	22,58	23,08	22,98
	<i>Desvio padrão</i>	1,74	1,61	1,77	2,24	3,17	1,97	2,08
	<i>Amplitude</i>	5,25	5,08	5,12	6,24	8,73	5,77	6,03
	<i>Média ponderada</i>	23,17	23,21	24,03	22,62	21,28	23,11	22,90
c	<i>Média aritmética</i>	23,24	22,95	23,55	23,85	23,64	23,63	23,48
	<i>Desvio padrão</i>	2,14	2,42	1,97	2,17	1,25	1,58	1,92
	<i>Amplitude</i>	7,48	8,85	5,75	7,16	4,21	5,12	6,43
	<i>Média ponderada</i>	23,90	22,87	23,80	24,34	23,55	23,63	23,68
b	<i>Média aritmética</i>	24,05	23,75	23,93	24,17	23,87	23,68	23,91
	<i>Desvio padrão</i>	1,84	2,01	2,16	1,95	1,95	2,01	1,99
	<i>Amplitude</i>	5,82	6,07	7,28	6,13	6,08	7,24	6,44
	<i>Média ponderada</i>	24,24	23,94	23,79	24,51	23,85	22,89	23,87
a	<i>Média aritmética</i>	24,04	23,55	23,97	23,76	23,30	23,30	23,66
	<i>Desvio padrão</i>	2,07	2,21	2,01	1,97	2,23	1,92	2,07
	<i>Amplitude</i>	9,48	9,90	9,15	9,48	9,26	7,47	9,13
	<i>Média ponderada</i>	24,15	24,05	22,65	24,14	23,55	23,07	23,60
árvore	<i>Média aritmética</i>	23,72	23,38	23,82	23,82	23,49	23,47	23,62
	<i>Desvio padrão</i>	1,97	2,11	1,98	2,01	2,05	1,85	1,99
	<i>Amplitude</i>	9,48	9,90	9,15	9,55	9,26	7,48	9,14
	<i>Média art. 1/2a</i>	24,47	24,29	24,61	24,36	23,68	23,18	24,10
	<i>Média ponderada</i>	24,08	23,77	23,27	24,22	23,56	23,11	23,67

A variação radial dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ apresentados na Figura 5, mostra declínio no sentido centro casca para quase todos os discos, com exceção dos discos a 87,5% (Figura 5A), onde a regressão linear de todos os pontos teve coeficiente angular positivo. Também é possível notar a oscilação dos pontos nos discos a 12,5% e 37,5%

(Figuras 5B, 5C e 5D) da altura das árvores conforme observado também para os valores de $\delta^2\text{H}$ nas figuras 4C e 4D.

A Tabela 3, apresenta os valores médios e a amplitude de variação para os valores de $\delta^{13}\text{C}$ com a média ponderada total de -27,11 mUr com amplitude de 3,70 mUr considerando todas as árvores. Essa amplitude exhibe a variação dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ na direção radial. A variação das médias ponderadas entre as seis árvores foi de apenas 1,20 mUr. Na direção longitudinal, os valores médios dos discos variaram entre -27,01 mUr (disco a) a -27,37 mUr (discos d) mostrando menor variação do que entre árvores. O valor médio da média aritmética da metade dos pontos dos discos a, ficaram consideravelmente próximos da média ponderada da árvore, mostrando que esta amostragem simplificada pode representar o valor médio ponderado da árvore.

Com relação à variação radial dos valores de $\delta^{18}\text{O}$, apresentados na figura 6, não é possível observar comportamento padrão de variação no sentido centro casca. Assim, é notório que a variação na direção radial para os valores de $\delta^{18}\text{O}$ é praticamente nula ou inexistente. No entanto, observa-se também um padrão de oscilações dos pontos, principalmente nos discos a 12,5% e 37,5% (Figuras 6C e 6D) da altura das árvores conforme observado nos valores de $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{13}\text{C}$ nas figuras 4C, 4D, 5C e 5D.

Os valores médios e a amplitude de variação para os valores de $\delta^{18}\text{O}$, apresentados na Tabela 4, mostram média ponderada total de +23,67 mUr com amplitude de 9,14 mUr considerando todas as árvores. A variação das médias ponderadas entre as seis árvores foi de 1,11 mUr. Na direção longitudinal, os valores médios dos discos variaram entre +22,90 mUr (disco d) a +23,87 mUr (discos b) mostrando praticamente a mesma variação entre árvores e evidenciando estabilidade nos valores de $\delta^{18}\text{O}$ na direção longitudinal. O valor médio da média aritmética da

metade dos pontos dos discos a, ficaram também muito próximos da média ponderada da árvore, mostrando que esta amostragem simplificada pode representar o valor médio ponderado da árvore.

5 DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho mostraram que é possível determinar os valores isotópicos de carbono, simultaneamente com os valores isotópicos de hidrogênio e oxigênio, da madeira inteira em um analisador elementar por conversão em alta temperatura acoplado a um IRMS com precisão equivalente ao método convencional por combustão da amostra. Os resultados também mostraram que a variação isotópica dentro de árvores clonais da espécie *E. grandis* é equicalente a variação entre árvores de mesmo clone cultivada em mesmo sitio. Também pela primeira vez, os resultados mostram que a amostragem reduzida, da média aritmética da metade dos pontos na direção radial até a casca do disco a 12,5% da altura da árvore é consideravelmente próximo ao valor médio ponderado da árvore toda.

Nas Figuras 2 e 3 os valores de $\delta^{13}\text{C}$ foram bastante coincidentes devido à alta precisão do HTC e do EA. No EA a incerteza padrão foi de $\pm 0,08$ mUr, enquanto que no HTC foi de $\pm 0,19$ mUr. A incerteza do HTC foi maior porque dentro do seu reator existe carbono vítreo utilizado para converter H_2O em H_2 e CO quando analisado amostras de água, por isso o HTC, muitas vezes é referenciado como analisador elementar inorgânico. No entanto, devido ao alto teor de carbono proveniente das amostras de madeira a conversão em alta temperatura deve utilizar preferencialmente o carbono orgânico da amostra do que o carbono vítreo. Vale ressaltar que o fabricante recomenda a temperatura de 1450°C somente para análise de amostra inorgânicas e para amostras orgânicas recomenda-se 1400°C . Assim, entende-se que o carbono vítreo só é liberado em temperaturas acima de 1400°C , no entanto, este limite de temperatura pode influenciar no aumento da incerteza para análises de $\delta^{13}\text{C}$ no HTC. Outro fator que poderia aumentar esta incerteza é a formação de CO_2 dentro

do reator devido ao alto teor de Oxigênio da amostra. Para isso foi instalado, logo na saída do reator um filtro de CO₂. Este filtro também diminui a incerteza dos valores $\delta^{18}\text{O}$, pois se o CO₂ entrar no IRMS é possível que seja detectado nos coletores 28, 29 e 30, mesmo com o sistema calibrado para estas massas e não para as massas do CO₂ (44, 45 e 46).

O EA é notoriamente o sistema mais utilizado para determinação de $\delta^{13}\text{C}$ em amostras de madeira, isso porque ele pode ser usado para outras amostras orgânicas e também para análise de $\delta^{15}\text{N}$ que é muito utilizada em plantas e animais. No entanto, se for necessário analisar $\delta^2\text{H}$, $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^{13}\text{C}$ em uma amostra de madeira, seria necessário a utilização dois sistemas, caso o HTC não analisasse o $\delta^{13}\text{C}$. Esta facilidade da análise simultânea de $\delta^2\text{H}$, $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{18}\text{O}$ no HTC demonstrada aqui no trabalho otimiza tanto o preparo das amostras quanto o custo das análises.

Considerando que, para usar a análise isotópica de $\delta^2\text{H}$, $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{18}\text{O}$ na madeira para determinar a origem geográfica no combater a extração ilegal e na certificação de plantios controlados, será necessário antes, a criação de um banco de dados dos valores de $\delta^2\text{H}$, $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{18}\text{O}$ das madeiras como já está sendo organizado por algumas instituições (GASSON et al., 2021). Neste sentido, a análise simultânea de $\delta^2\text{H}$, $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{18}\text{O}$ demonstrada aqui pode contribuir muito para a elaboração deste banco de dados otimizando a análise.

A variação radial de $\delta^2\text{H}$, aumentando no sentido centro-casca, principalmente nos discos mais baixos da Figura 4D, pode ter ocorrido devido a um fracionamento isotópico do Hidrogênio durante o início do crescimento da árvore. Neste momento inicial a planta necessita de muita água, o que pode resultar em um fracionamento dos isótopos Hidrogênio, fazendo com que os mais pesados ^2H (deutério) tendem a não subir pelo xilema da raiz até os estômatos das folhas durante a transpiração. A

medida em que a planta vai crescendo este fracionamento isotópico vai diminuindo, pois, este aumento dos valores de $\delta^2\text{H}$ da Figura 4D só é evidenciado na região da planta que foi formada primeiro.

Na Figura 6D, é possível notar, mas não confirmar que os discos a 12,5% também apresentam aumento inicial dos valores de $\delta^{18}\text{O}$, confirmando a hipótese de fracionamento isotópico da água no início do crescimento da planta. Esta hipótese deve ser melhor investigado, pois, pode ser que a planta tenha sido clonada em viveiro silvicultural muito distante antes de ser plantada, e assim, aquele sinal seja da água do local do viveiro das mudas. As oscilações dos valores isotópicos ao longo da direção radial dos discos observadas nas Figuras 4C, 4D, 5C, 5D, 6C e 6D deve fazer referência aos anéis de crescimento muito utilizados em estudos climático e não destacados neste estudo. Estas oscilações também contribuíram para aumentar a amplitude de variação dos valores isotópicos, principalmente de $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$.

Os valores da média aritmética da metade dos pontos dos discos a, da amostragem simplificada, ficaram mais próximos da média ponderada da árvore porque a ponderação, tanto do disco, quando da árvore, pondera mais os valores dos pontos mais próximos da casca, como também os valores dos discos com maior área conforme equações 2 e 4. Se considerarmos o disco formado por apenas dois anéis de área A_1 (1ª metade do raio até o centro) e A_2 (2ª metade do raio até a casca) conforme equação 3, A_2 terá três vezes a área de A_1 . Assim, a média aritmética da metade dos pontos até a casca do raio do disco representa 75% da área, ou seja, 75% da ponderação do disco. A ponderação na árvore também pondera mais o disco a 12,5% da altura por ter uma área maior que os outros discos. Em média a área do disco a 12,5% corresponde a quase 50% da soma de todas as áreas dos quatro discos da árvore, ou seja, esta amostragem simplificada pode representar mais de um terço

do valor isotópico da árvore considerando 75% no disco a 12,5% e que a área deste disco corresponde a 50% da área de todos os discos.

Diante disso, essa amostragem simplificada e demonstrada aqui neste trabalho, além de ser muito próximo os valores da média ponderada da árvore, não considera os valores isotópicos mais baixos próximo ao centro do disco, principalmente para $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$. Vale destacar que esta amostragem simplificada de pontos na direção radial pode ser substituída pela extração de uma baguete fina de madeira extraída na árvore plantada, sem a necessidade de corte do disco. Neste caso, uma baguete de comprimento igual a metade do raio, ou igual a $\frac{1}{4}$ do diâmetro poderia ser extraída e moída por inteiro para determinação dos valores médios de $\delta^2\text{H}$, $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{18}\text{O}$ na árvore em pé.

6 CONCLUSÕES

Por fim, neste trabalho concluímos que é possível realizar a análise isotópica de carbono em amostras de madeira inteira utilizando um analisador elementar por conversão em alta temperatura. Também demonstramos que a variação isotópica dentro da madeira de árvores da espécie *Eucalyptus grandis* é reduzida em relação à variação isotópica entre árvores do mesmo tratamento. Logo, a amostragem simplificada de madeira pode comprovadamente estimar o valor isotópico médio da árvore em toda a sua dimensão.

REFERÊNCIAS

- ANDREU-HAYLES, L. *et al.* A high yield cellulose extraction system for small whole wood samples and dual measurement of carbon and oxygen stable isotopes. **Chemical Geology**, v. 504, n. September 2018, p. 53–65, 2019.
- BOETTGER, T. *et al.* Reduced climate sensitivity of carbon, oxygen and hydrogen stable isotope ratios in tree-ring cellulose of silver fir (*Abies alba* Mill.) influenced by background SO₂ in Franconia (Germany, Central Europe). **Environmental Pollution**, v. 185, p. 281–294, 2014.
- BONTEMPO, L. *et al.* Characterisation and attempted differentiation of European and extra-European olive oils using stable isotope ratio analysis. **Food Chemistry**, v. 276, n. September 2018, p. 782–789, 2019.
- BOOTH, A. L. *et al.* Tracing geographic and temporal trafficking patterns for marijuana in Alaska using stable isotopes (C, N, O and H). **Forensic Science International**, v. 202, n. 1–3, p. 45–53, 2010.
- BRAND, W. A.; COPLEN, T. B. Stable isotope deltas: tiny, yet robust signatures in nature. **Isotopes in Environmental and Health Studies**, v. 48, n. 3, p. 393–409, set. 2012.
- BRIDGE, M. Locating the origins of wood resources: A review of dendroprovenancing. **Journal of Archaeological Science**, v. 39, n. 8, p. 2828–2834, 2012.
- BVRIO. Uso de Big Data para detecção de ilegalidade no Setor de Madeira Tropical. 2016.
- CINTRA, B. *et al.* Contrasting controls on tree ring isotope variation for Amazon floodplain and terra firme trees. **Tree Physiology**, v. 39, n. 5, p. 845–860, 1 maio 2019.
- COOK, C. S. *et al.* Stable Isotope Biogeochemistry and Ecology: Laboratory Manual. 2017.
- COPLEN, T. B. Guidelines and recommended terms for expression of stable-isotope-ratio and gas-ratio measurement results. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 25, n. 17, p. 2538–2560, 15 set. 2011.
- CORREA-DÍAZ, A. *et al.* From Trees to Ecosystems: Spatiotemporal Scaling of Climatic Impacts on Montane Landscapes Using Dendrochronological, Isotopic, and Remotely Sensed Data. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 34, n. 3, p. 1–20, mar. 2020.
- DORMONTT, E. E. *et al.* Forensic timber identification: It's time to integrate disciplines to combat illegal logging. **Biological Conservation**, v. 191, p. 790–798, nov. 2015.
- EL SHEIKHA, A. F. *et al.* Novel molecular fingerprinting for geographical traceability

of timber. **Journal of Tropical Forest Science**, 2013.

FABERI, A. *et al.* Italian Cheeses Discrimination by Means of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ Isotopic Ratio Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 5, p. 1467–1475, 2018.

GASSON, P. E. *et al.* WorldForestID: Addressing the need for standardized wood reference collections to support authentication analysis technologies; a way forward for checking the origin and identity of traded timber. **PLANTS, PEOPLE, PLANET**, v. 3, n. 2, p. 130–141, 26 mar. 2021.

GEHRE, M.; STRAUCH, G. High-temperature elemental analysis and pyrolysis techniques for stable isotope analysis. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 17, n. 13, p. 1497–1503, 15 jul. 2003.

GORI, Y.; STRADIOTTI, A.; CAMIN, F. Timber isoscapes. A case study in a mountain area in the Italian Alps. **PLOS ONE**, v. 13, n. 2, p. e0192970, 16 fev. 2018.

GRIBOFF, J. *et al.* Multielemental + isotopic fingerprint enables linking soil, water, forage and milk composition, assessing the geographical origin of Argentinean milk. **Food Chemistry**, v. 283, n. January, p. 549–558, 2019.

GUERRIERI, R. *et al.* Evaluating climate signal recorded in tree-ring $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$ values from bulk wood and α -cellulose for six species across four sites in the northeastern US. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 31, n. 24, p. 2081–2091, 30 dez. 2017.

HAJJ, F. *et al.* Radiogenic and “stable” strontium isotopes in provenance studies: A review and first results on archaeological wood from shipwrecks. **Journal of Archaeological Science**, v. 86, p. 24–49, out. 2017.

HANECA, K. *et al.* Provenancing Baltic timber from art historical objects: success and limitations. **Journal of Archaeological Science**, v. 32, n. 2, p. 261–271, fev. 2005.

HORACEK, M.; JAKUSCH, M.; KREHAN, H. Control of origin of larch wood: Discrimination between European (Austrian) and Siberian origin by stable isotope analysis. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 2009.

HURLEY, J. M.; WEST, J. B.; EHLERINGER, J. R. Stable isotope models to predict geographic origin and cultivation conditions of marijuana. **Science and Justice**, v. 50, n. 2, p. 86–93, 2010.

IBÁ. **Dados estatísticos**, p. 80, 2019.

KAMILOGLU, S. Authenticity and traceability in beverages. **Food Chemistry**, v. 277, n. October 2018, p. 12–24, 2019.

KAWASHIMA, H.; SUTO, M.; SUTO, N. Stable carbon isotope ratios for organic acids in commercial honey samples. **Food Chemistry**, v. 289, n. August 2018, p. 49–55, 2019.

KNÖLLER, K. *et al.* Carbon isotope analyses of cellulose using two different on-line techniques (elemental analysis and high-temperature pyrolysis)-a comparison. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, n. 3, p. 343–348, 15 fev. 2005a.

- KNÖLLER, K. *et al.* Carbon isotope analyses of cellulose using two different on-line techniques (elemental analysis and high-temperature pyrolysis)-a comparison. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, n. 3, p. 343–348, 15 fev. 2005b.
- LEE, S. *et al.* Spatial variability in hydrogen and oxygen isotopic composition of Korean Red Pine and its implication for tracing wood origin. **Environmental Earth Sciences**, v. 73, n. 12, p. 8045–8052, 24 jun. 2015.
- LILES, G. C. *et al.* Two Decades of Experimental Manipulation Reveal Potential for Enhanced Biomass Accumulation and Water Use Efficiency in Ponderosa Pine Plantations Across Climate Gradients. **Journal of Geophysical Research: Biogeosciences**, v. 124, n. 7, p. 2321–2334, 25 jul. 2019.
- LIU, H. T. *et al.* An oxygen isotope chronometer for cellulose deposition: the successive leaves formed by tillers of a C 4 perennial grass. **Plant, Cell & Environment**, v. 40, n. 10, p. 2121–2132, out. 2017.
- LIU, J. *et al.* Stable carbon isotope signatures of cellulose in macrophytes collected from three eutrophic lakes in China. **Limnologica**, v. 81, n. June 2019, p. 125758, mar. 2020.
- MATOS, M. P. V.; JACKSON, G. P. Isotope ratio mass spectrometry in forensic science applications. **Forensic Chemistry**, v. 13, n. January, p. 100154, 2019.
- MEIER-AUGENSTEIN, W. From stable isotope ecology to forensic isotope ecology — Isotopes' tales. **Forensic Science International**, v. 300, p. 89–98, 2019.
- MORAIS, A. P.; SANSÍGOLO, C. A.; NETO, M. Effects of autohydrolysis of Eucalyptus urograndis and Eucalyptus grandis on influence of chemical components and crystallinity index. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 623–628, ago. 2016.
- OHASHI, S. *et al.* Seasonal variations in the stable oxygen isotope ratio of wood cellulose reveal annual rings of trees in a Central Amazon terra firme forest. **Oecologia**, v. 180, n. 3, p. 685–696, 30 mar. 2016.
- OKAZAKI, A.; YOSHIMURA, K. Global Evaluation of Proxy System Models for Stable Water Isotopes With Realistic Atmospheric Forcing. **Journal of Geophysical Research: Atmospheres**, v. 124, n. 16, p. 8972–8993, 27 ago. 2019.
- PACHECO, A. *et al.* Growth, wood anatomy and stable isotopes show species-specific couplings in three Mexican conifers inhabiting drought-prone areas. **Science of The Total Environment**, v. 698, p. 134055, jan. 2020.
- PAUL, D.; SKRZYPEK, G.; FÓRIZS, I. Normalization of measured stable isotopic compositions to isotope reference scales – a review. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, n. 18, p. 3006–3014, 30 set. 2007.
- PAYN, T. *et al.* Changes in planted forests and future global implications. **Forest Ecology and Management**, v. 352, p. 57–67, set. 2015.
- 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**, v. 442, p. 47–53, nov. 2016.

RAO, Z. et al. Long-term summer warming trend during the Holocene in central Asia indicated by alpine peat α -cellulose $\delta^{13}\text{C}$ record. **Quaternary Science Reviews**, v. 203, p. 56–67, jan. 2019.

SARGEANT, C. I.; SINGER, M. B.; VALLET-COULOMB, C. Identification of Source-Water Oxygen Isotopes in Trees Toolkit (ISO-Tool) for Deciphering Historical Water Use by Forest Trees. **Water Resources Research**, v. 55, n. 12, p. 10954–10975, 20 dez. 2019.

SAURER, M. et al. Spatial and temporal oxygen isotope trends at the northern tree-line in Eurasia. **Geophysical Research Letters**, v. 29, n. 9, p. 7-1-7–4, 2002.

SCHLESER, G. H. et al. A remarkable relationship of the stable carbon isotopic compositions of wood and cellulose in tree-rings of the tropical species *Cariniana micrantha* (Ducke) from Brazil. **Chemical Geology**, v. 401, p. 59–66, abr. 2015.

SCHOLLAEN, K. et al. A guideline for sample preparation in modern tree-ring stable isotope research. **Dendrochronologia**, v. 44, p. 133–145, jun. 2017.

SCHOOK, D. M. et al. Short- and long-term responses of riparian cottonwoods (*Populus* spp.) to flow diversion: Analysis of tree-ring radial growth and stable carbon isotopes. **Science of The Total Environment**, v. 735, p. 139523, set. 2020.

SHI, F. et al. Precipitation $\delta^{18}\text{O}$ Recorded by the α -Cellulose $\delta^{18}\text{O}$ of Plant Residues in Surface Soils: Evidence From a Broad Environmental Gradient in Inland China. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 33, n. 11, p. 1440–1468, 26 nov. 2019.

SNIF. Boletim SNIF 2018. p. 1391, 2018.

SONG, L. et al. Divergent growth responses to warming and drying climates between native and non-native tree species in Northeast China. **Trees**, v. 33, n. 4, p. 1143–1155, 23 ago. 2019.

VAN DER SLEEN, P.; ZUIDEMA, P. A.; PONS, T. L. Stable isotopes in tropical tree rings: theory, methods and applications. **Functional Ecology**, v. 31, n. 9, p. 1674–1689, set. 2017.

VOELKER, S. L. et al. Tree-ring isotopes adjacent to Lake Superior reveal cold winter anomalies for the Great Lakes region of North America. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 4412, 13 dez. 2019.

VOLTAS, J. et al. Shared drought responses among conifer species in the middle Siberian taiga are uncoupled from their contrasting water-use efficiency trajectories. **Science of The Total Environment**, v. 720, p. 137590, jun. 2020.