

FAST QUALITATIVE METHOD BASED ON ELECTRON PARAMAGNETIC RESONANCE (EPR) TO DATE *Gmelina arborea* AND *Araucaria angustifolia* WOOD

MÉTODO CUALITATIVO RÁPIDO BASADO EN RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA PARA DATAR MADERA DE *Gmelina arborea* Y *Araucaria angustifolia*

G. Inés Bolzón-de Muñiz¹, M. Guadalupe Lomelí-Ramírez², Antonio S. Mangrich³, G. Guadalupe Carbajal- Arizaga^{4*}

¹Departamento de Engenharia e Tecnologia Florestal. Universidade Federal do Paraná. Avenida Lothario Meissner, 632, CEP. 80210-170, Curitiba, Paraná, Brasil. ²Departamento de Madera, Celulosa y Papel. Universidad de Guadalajara, Km 15.5, Carretera Guadalajara-Nogales, 45020 Guadalajara, Jalisco, México. ³Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, UFPR, Centro Politécnico - Jardim das Américas, 81531-990, Curitiba, PR, Brasil. & Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia, Energia & Ambiente, UFBA, 40170-290, Salvador, BA, Brasil. ⁴Departamento de Química. Universidad de Guadalajara. Marcelino García Barragan 1421, C.P. 44430, Guadalajara, Jalisco, México. (gregoriocarbjal@yahoo.com.mx)

ABSTRACT

In Brazil, *Gmelina arborea* is a common tree to produce char and the content of carbon is an important factor to correlate with the energy content or carbon sequestration capability, whereas *Araucaria angustifolia* occupies 6 % of its original territory and Brazilian laws protect old native specimens, since the commercial use of wood is restricted for young cultivated specimens. Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy is used for detection and quantification of organic free radicals (OFR) and, in this study, it was utilized for exploring OFR content along the rings of one log from *G. arborea* and *A. angustifolia* trees, both randomly chosen. The amount of OFR correlated with the carbon content in *G. arborea* and the age of rings in *G. arborea* and *A. angustifolia*. The content of OFR in rings of *Gmelina arborea* was compared with previous analyses of carbon sequestration in the same tree. Without statistical treatment, an inverse relationship between the carbon and OFR content was found. The concentration of OFR in inner rings (older ages) of *A. angustifolia* was higher than in outer rings (younger ages). This trend was also observed in *G. arborea*, suggesting that EPR provides qualitative information about the age. Additionally, a Pleistocene sample of *A. angustifolia* was analyzed and the content of OFR was one order of magnitude higher than that in the young sample. In conclusion, EPR spectroscopy is proposed as a fast qualitative method to identify the age of wood, especially for

RESUMEN

En Brasil, *Gmelina arborea* es un árbol para producir carbón y el contenido de carbono es un factor importante correlacionado con el contenido de energía o la capacidad de secuestro de carbono, mientras que la *Araucaria angustifolia* ocupa el 6 % de su territorio original y las leyes brasileñas protegen los viejos especímenes nativos, ya que el uso comercial de la madera está restringido para ejemplares jóvenes cultivados. La espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (EPR) se usa para la detección y cuantificación de los radicales orgánicos libres (OFR, siglas en inglés) y en este estudio se usó para explorar el contenido de OFR en los anillos de un tronco de árbol de *G. arborea* y otro de *A. angustifolia* elegidos al azar. La cantidad de OFR se correlacionó con el contenido de carbono en *G. arborea* y con la edad de los anillos de *G. arborea* y *A. angustifolia*. El contenido de OFR en los anillos de *G. arborea* se comparó con análisis previos de secuestro de carbono en el mismo árbol. Sin tratamiento estadístico, se encontró una relación inversa entre el contenido de carbono y OFR. La concentración de OFR en los anillos internos (de más edad) de *A. angustifolia* fue mayor que en los anillos externos (de menor edad). Esta tendencia también se observó en *G. arborea*, lo que sugiere que EPR proporciona información cualitativa acerca de la edad. Además, se analizó una muestra del Pleistoceno de *A. angustifolia* y el contenido de OFR fue de una magnitud mayor que en la muestra más joven. En conclusión, la espectroscopia EPR se propone como un método cualitativo rápido para identificar la edad de la madera, especialmente para cargas de madera confiscadas en áreas protegidas de *A. angustifolia* y para determinar el contenido de carbono en la madera.

* Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: January, 2013. Approved: July, 2014.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 48: 739-749. 2014.

confiscated wood loads in protected areas of *A. angustifolia* and to determine the carbon content in wood.

Keywords: *Araucaria angustifolia*, electron paramagnetic resonance, organic free radicals, *Gmelina arborea*.

INTRODUCTION

Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy measures the absorption of electromagnetic waves by paramagnetic species, such as organic free radicals (OFR), allowing their quantification in solid or liquid samples (Budziak *et al.*, 2004; Mangrich *et al.*, 2009; Guedes *et al.*, 2003). EPR spectroscopy is used along with other techniques as a method to date archaeological samples of mega-fauna (Kinoshita *et al.*, 2008; Joannes-Boyau and Grün, 2011) and charred wood (Triantafyllou *et al.*, 2010). The formation of OFR in wood occurs by weathering, mainly when it is exposed to visible or ultraviolet light (Kalnins *et al.*, 1966) or as a response to chemical agents in the environment like fungi or enzymes, including mechanical and physical stress (Hon and Feist, 1981).

The classical method to quantify OFR in plants is based on a colorimetric assay with 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrozyl (DPPH) and an ethanol/water extract of the plant, where the OFR reacts and develop a color measured at 515-520 nm (Sithisarn *et al.*, 2005; McCune and Johns, 2007; Rocha-Guzman *et al.*, 2007). Another method is through deoxyribose degradation by OFR, which is also followed by colorimetry (Rocha-Guzman *et al.*, 2007; Rocha-Guzman *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2014).

The usefulness and practicality of the EPR spectroscopy as an alternative route for characterization in forest sciences should be evaluated, since this technique allows fast and chemical reagents-free quantifications of OFR. In this regard, Illman and Bajts (1997) proposed that the single signal detected by EPR with the specific value of the g factor equal to 2.0 could be the fingerprint for wood. Although this task is not feasible since the OFR signal changes slightly from sample to sample, another information can be monitored, such as the amount of humic substances along the composting process of pine sawdust (Budziak *et al.*, 2004).

Palabras clave: *Araucaria angustifolia*, resonancia paramagnética electrónica, radicales libres orgánicos, *Gmelina arborea*.

INTRODUCCIÓN

La espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR) mide la absorción de ondas electromagnéticas de especies paramagnéticas, como los radicales libres orgánicos (OFR), lo que permite su cuantificación en muestras sólidas o líquidas (Budziak *et al.*, 2004; Mangrich *et al.*, 2009; Guedes *et al.*, 2003). La espectroscopia EPR se usa con otras técnicas como método para datar muestras arqueológicas de megafauna (Kinoshita *et al.*, 2008; Joannes-Boyau y Grün, 2011) y la madera carbonizada (Triantafyllou *et al.*, 2010). La formación de OFR en la madera se produce por intemperismo, sobre todo cuando se expone a la luz visible o ultravioleta (Kalnins *et al.*, 1966) o como respuesta a los agentes químicos del medioambiente, como hongos o enzimas, incluyendo el estrés mecánico y físico (Hon y Feist, 1981).

El método clásico para cuantificar OFR en las plantas se basa en una prueba colorimétrica con 1,1-difenil-2-picrilo-hidroazyl (DPPH) y un extracto de etanol/agua de la planta, donde el OFR reacciona y desarrolla un color medido a 515-520 nm (Sithisarn *et al.*, 2005; McCune y Johns, 2007; Rocha-Guzmán *et al.*, 2007). Otro método es a través de la degradación de desoxirribosa por OFR, que también es seguido por colorimetría (Rocha-Guzmán *et al.*, 2007; Rocha-Guzmán *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2014).

La utilidad y viabilidad de la espectroscopia EPR como una ruta alternativa para la caracterización en las ciencias forestales se deben evaluar, ya que esta técnica permite cuantificaciones de OFR rápidas y libres de reactivos químicos. En este sentido, Illman y Bajts (1997) propusieron que la señal única detectada por EPR con el valor específico del factor g igual a 2.0 podría ser la huella digital para la madera. Aunque esta tarea no es factible ya que la señal OFR cambia ligeramente de una muestra a otra, se puede monitorear otra información, como la cantidad de sustancias húmicas a lo largo del proceso de compostaje del aserrín de pino (Budziak *et al.*, 2004).

En este estudio se recogieron muestras de *Araucaria angustifolia*, que ocupa 6 % de su territorio original en Brasil (Oliveira *et al.*, 2007), además de

In this study, samples were collected from *Araucaria angustifolia*, which currently occupies 6 % of its original territory in Brazil (Oliveira *et al.*, 2007), plus samples from *Gmelina arborea* Roxb., harvested in the coastal side of Parana State (South Brazil) and used in a previous report (Marcene *et al.*, 2006) to quantify the carbon content. Therefore, the objective of this study was to acquire the EPR spectra of wood samples and evaluate the content of OFR along different rings of both trees, that is to say, along different ages, since each ring correspond to one year of life (Starr and Taggart, 2008). Two additional samples of *A. angustifolia* were analyzed, and these were used to find a relationship between the OFR concentration and age of trees.

MATERIALS AND METHODS

The *G. arborea* Roxb. and *A. angustifolia* (recently harvested and one corresponding to the Pleistocene age) samples were randomly collected from the Department of Forest Engineering and Technology of the Federal University of Parana State, Brazil. The fresh *A. angustifolia* sample corresponds to a cultivated tree, not a native one.

EPR spectra were obtained in a Bruker EMX spectrometer (Bruker Bio Spin, Germany) operated in the X-band (~9.5 GHz) at room temperature (300 K) in a range of magnetic field between 3485 and 3535 Gauss.

One log from *G. arborea* Roxb. and one from *A. angustifolia* was separated in rings and mechanically grinded up to powder sizes below 0.25 cm. The size is an important factor because it allows the particles to fill the EPR quartz tube without leaving voids. The amount of OFR was calculated from the area of the absorption curve in the normal mode taking as starting and end point of the absorption the value above the zero (dashed line). Due to the high concentration of OFR, the signal to noise ratio was not corrected.

The areas of the absorption spectra were compared with the weak pitch reference sample supplied by Bruker with 1.04×10^{13} spin cm^{-1} (dark line in Figure 1). Absorption areas for curves with the same shape are related with the amount of free radicals (Lee *et al.*, 2000), which were related with the mass of wood placed in the tube to calculate the number of spin per gram of sample, i.e. number of radicals per gram. This method was applied in samples of humus (Budziak *et al.*, 2004), mangrove sediments (Mangrich *et al.*, 2009), biochar (Angelo *et al.*, 2013), coffee powder (Krakowian *et al.*, 2014), human tissue and polyolefines (Camara *et al.*, 2006).

muestras de *Gmelina arborea* Roxb., recolectado en la zona costera del Estado de Paraná (sur de Brasil) y utilizado en un informe anterior (Marcene *et al.*, 2006) para cuantificar el contenido de carbono. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue adquirir los espectros de EPR de muestras de madera y evaluar el contenido de OFR a lo largo de diferentes anillos de ambos árboles, es decir, en diferentes edades, ya que cada anillo corresponde a un año de vida (Starr y Taggart, 2008). Dos muestras adicionales de *A. angustifolia*, se analizaron y se usaron para encontrar una relación entre la concentración de OFR y la edad de los árboles.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de *G. arborea* Roxb. y *A. angustifolia* (de reciente cosecha y una que corresponde a la edad del Pleistoceno) se tomaron al azar del Departamento de Ingeniería Forestal y Tecnología de la Universidad Federal del Estado de Paraná, Brasil. La muestra de *A. angustifolia* corresponde a un árbol cultivado, no a uno nativo.

Los espectros de EPR se obtuvieron en un espectrómetro Bruker EMX (Bruker Bio Spin, Alemania) operado en la banda X (~9.5 GHz) a temperatura ambiente (300 K) en un rango de campo magnético entre 3485 y 3535 Gauss.

Un tronco de *G. arborea* Roxb. y otro de *A. angustifolia* se separaron en anillos y se molieron mecánicamente hasta convertirlos en polvo de menos de 0.25 cm. El tamaño es un factor importante, ya que permite que las partículas llenen el tubo de cuarzo EPR sin dejar huecos. La cantidad de OFR se calculó a partir del área de la curva de absorción en el modo normal, tomando como punto inicial y final de la absorción el valor por encima del cero (línea discontinua). Debido a la alta concentración de OFR, la señal para la relación de ruido no se corrigió.

Las áreas de los espectros de absorción se compararon con la muestra de referencia *weak pitch* suministrado por Bruker con 1.04×10^{13} spin cm^{-1} (línea oscura en la Figura 1). Las áreas de absorción para las curvas con la misma forma están relacionadas con la cantidad de radicales libres (Lee *et al.*, 2000), que se relacionaron con la cantidad de madera colocada en el tubo para calcular el número de *spin* por gramo de muestra, es decir, el número de radicales por gramo. Este método se aplicó en muestras de humus (Budziak *et al.*, 2004), en sedimentos de manglares (Mangrich *et al.*, 2009), biochar (Angelo *et al.*, 2013), polvo de café (Krakowian *et al.*, 2014), tejido humano y poliolefinas (Camara *et al.*, 2006).

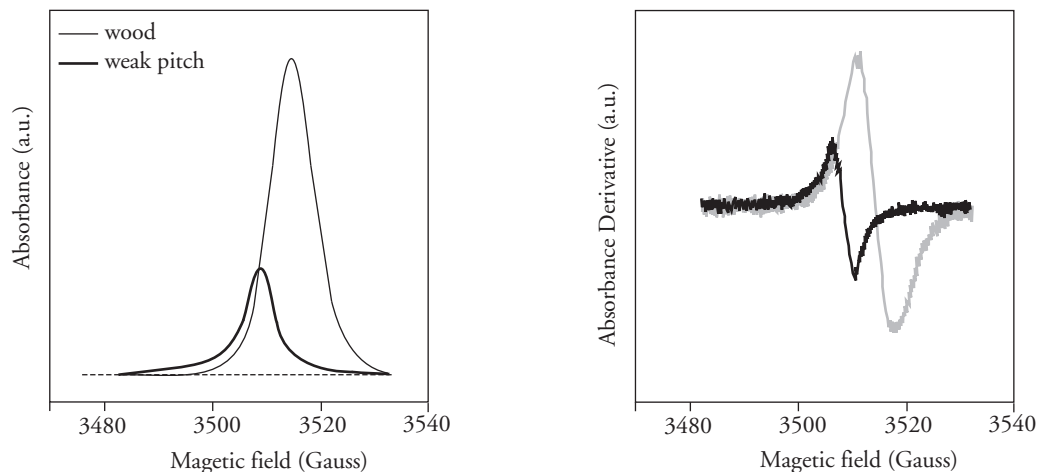


Figure 1. EPR spectra in the normal absorption mode (left) used to integrate the area under curve and the corresponding first derivative plot (right) for better visualization of absorption regions.

Figura 1. Espectros de EPR en el modo de absorción normal (izquierda) utilizado para integrar el área bajo la curva y el gráfico en primera derivada (derecha) para una mejor visualización de las regiones de absorción.

RESULTS AND DISCUSSION

Free radicals in *Gmelina arborea*

The EPR spectra of *G. arborea* samples presented a clear signal of OFR (Figure 2). The g factor is the characteristic value that helps to identify paramagnetic species. The OFR signal with $g \sim 2.0040$ has the spin density probably more localized on oxygen atoms, and with $g \sim 2.0025$ has the spin density localized near carbon atoms. OFR at intermediary distance between carbon and oxygen atoms was found in

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Radicales libres en *Gmelina arborea*

Los espectros EPR de muestras de *G. arborea* presentaron una señal clara de OFR (Figura 2). El factor g es el valor característico que ayuda a identificar las especies paramagnéticas. La señal de OFR con $g \sim 2.0040$ tiene la densidad de espín probablemente más localizada en átomos de oxígeno, y con $g \sim 2.0025$ tiene la densidad de espín localizada cerca de los átomos de carbono. Los OFR a una distancia

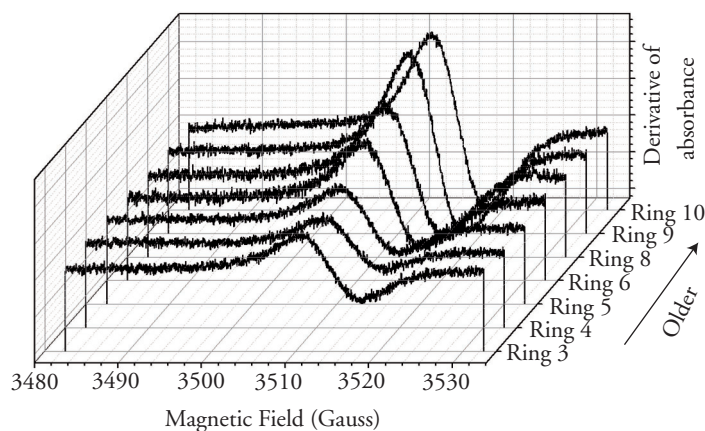


Figure 2. EPR spectra of the rings extracted from the log of *Gmelina arborea*.

Figura 2. Espectros de EPR de los anillos extraídos del tronco de *Gmelina arborea*.

Pinus taeda samples with $g=2.0030$ (Budziak *et al.*, 2004), associated to lignin (Pryor, 1992; Budziak *et al.*, 2004; Czechowski *et al.*, 2004). The *G. arborea* samples in our study presented values between 2.0046 and 2.0047, which match with the g factors found for semiquinones (around oxygen atoms) in wood (Yen *et al.*, 1962; Guedes *et al.*, 2003), which can be even higher, $g=2.0050$ (Zhou *et al.*, 2009). Then, it is reasonable to accept that the EPR signals detected in *G. arborea* correspond to free radicals in semiquinone structures.

The intensity of the signals in Figure 2 increases from the outer to the inner rings. The line intensity is proportional to the concentration of paramagnetic species (organic free radicals in this case). The samples were stored under the same moisture environment in order for the humidity to be the same for each one, because a large variation of water could intensify the EPR signal in wood (Humar *et al.* 2006).

The derived absorption signals were integrated with the WinEPR program (Bruker) and the areas were compared with the area of the weak pitch sample in order to obtain the number of spins that contributed to that signal. By knowing the mass of wood placed in the tube, the number of spins (free radicals) per gram of sample was determined (Table 1).

The magnitude of free radicals concentration in all the samples was around 10^{12} spin g^{-1} and is lower than the concentration of free radicals in

intermedia entre átomos de carbono y oxígeno se encontraron en muestras de *Pinus taeda* con $g=2.0030$, asociado a la lignina (Pryor, 1992; Budziak *et al.*, 2004; Czechowski *et al.*, 2004). Las muestras de *G. arborea* presentaron valores entre 2.0046 y 2.0047, los cuales coinciden con los factores g encontrados en las semiquinonas (alrededor de los átomos de oxígeno) en la madera (Yen *et al.*, 1962; Guedes *et al.*, 2003), que pueden ser incluso superiores, $g=2.0050$ (Zhou *et al.*, 2009). Entonces, es razonable aceptar que las señales EPR detectadas en *G. arborea* corresponden a los radicales libres que hay en las estructuras de semiquinonas.

La intensidad de las señales en la Figura 2 aumenta de los anillos externos a los internos. La intensidad de la línea es proporcional a la concentración de especies paramagnéticas (en este caso, radicales libres orgánicos). Las muestras se almacenaron bajo el mismo ambiente de humedad a fin de que la humedad fuera la misma para cada uno, porque una gran variación de agua podría intensificar la señal de EPR en la madera (Humar *et al.*, 2006).

Las señales de derivada de la absorción se integraron con el programa WinEPR (Bruker) y las áreas se compararon con el área de la muestra *weak pitch* a fin de obtener el número de *spin* que contribuyeron a esa señal. Al conocer la masa de madera colocada en el tubo, se determinó el número de *spin* (radicales libres) por gramo de muestra (Cuadro 1).

La magnitud de la concentración de radicales libres en todas las muestras fue de alrededor de 10^{12} *spin* g^{-1} y es menor que la concentración de radicales libres en muestras frescas o compostadas de *P. taeda* (10^{15} espín g^{-1}) (Budziak *et al.*, 2004). La Figura 3A muestra la relación entre la concentración de los radicales libres y los anillos formados en diferentes edades del árbol. Aunque no hay un comportamiento lineal en estos datos experimentales ($R^2=0.54$), es evidente que la mayor cantidad de radicales libres aparece en los anillos internos (edades mayores). Si los datos dispersos fueran eliminados (Figura 3B), como los valores de los anillos 6 y 8, la tendencia central recalculada estaría cerca de la linealidad ($R^2=0.98$).

No es raro encontrar una menor concentración de radicales libres en los anillos más jóvenes (externos) ya que el metabolismo se lleva a cabo ahí (Starr y Taggart, 2008) y evita la formación de radicales libres o los elimina. Este hecho se detectó cuando las muestras de madera se analizaron por medio de EPR

Table 1. Concentration of free radicals and g EPR factors along the rings of the *Gmelina arborea* tree.

Cuadro 1. Concentración de los radicales libres y los factores g de EPR en los anillos del árbol de *Gmelina arborea*.

Ring age (years)	g factor	Radicals (spin g^{-1})
3	2.0047	1.38×10^{12}
4	2.0046	1.52×10^{12}
5	2.0047	1.50×10^{12}
6	2.0046	1.14×10^{12}
8	2.0047	1.12×10^{12}
9	2.0047	1.90×10^{12}
10	2.0047	2.13×10^{12}

The weak pitch reference (Bruker) had $g=2.0028$. Each ring is equivalent with one year of life (Starr and Taggart, 2008) ♦ La referencia *weak pitch* (Bruker) tuvo $g=2.0028$. Cada anillo es equivalente a un año de vida (Starr y Taggart, 2008).

fresh or composted samples of *P. taeda* (10^{15} spin g^{-1}) (Budziak *et al.*, 2004). Figure 3A shows the relationship between the free radicals concentration and the rings formed in different ages of the tree. Although there is not a linear behavior in this experimental data ($R^2=0.54$), it is clear that the higher amount of free radicals appear in inner rings (older ages). If the dispersed data were eliminated (Figure 3B), such as values of rings 6 and 8, the recalculated central tendency is close to linearity ($R^2=0.98$).

It is not unusual to find lower concentration of free radicals in younger rings (outer) since the metabolism takes place there (Starr and Taggart 2008) and it avoids formation of free radicals or eliminates them. This fact was probed when wood samples were analyzed by EPR just after collecting them from the tree. In the first minutes, negligible EPR signals were recorded, whereas the intensity of free radicals increased with time up to 2 h and then became constant (Hon *et al.*, 1980). In *Gmelina* samples the time was not considered since all the samples had much more than 2 h, and then the amount of free radicals is not supposed to change (Hon *et al.*, 1980). Similarly, a large difference in the water content could lead to differences in the intensities (Humar *et al.*, 2006), but the same drying conditions were applied to all the samples in this work.

Although the physiological processes regulate the formation of free radicals in the external rings, there

justo después de recogerlas del árbol. En los primeros minutos se registraron señales de EPR insignificantes, mientras que la intensidad de los radicales libres aumentó con el tiempo hasta 2 h y luego se hizo constante (Hon *et al.*, 1980). En las muestras de *Gmelina* no se consideró el tiempo ya que todas las muestras tenían mucho más de 2 h, y para entonces no se supone que la cantidad de radicales libres cambiara (Hon *et al.*, 1980). Del mismo modo, una gran diferencia en el contenido de agua podría dar lugar a diferencias en las intensidades (Humar *et al.*, 2006), pero las mismas condiciones de secado se aplicaron a todas las muestras en este estudio.

Aunque los procesos fisiológicos regulan la formación de radicales libres en los anillos externos, hay fenómenos opuestos que inducen la formación de radicales en los anillos externos, tales como la incidencia de la luz UV-VIS (Kalnin *et al.*, 1966), e incluso la exposición indirecta a la luz visible aumenta la cantidad de radicales libres en la madera (Kalnin *et al.*, 1966). En el presente estudio se encontraron radicales libres en los anillos externos (anillos 3-5, Figura 3a), que no son sistemas herméticos; por lo tanto, la difusión de los compuestos con la capacidad de eliminar los radicales de los anillos en el medio del tronco, (anillos 6 y 8, Figura 3A), puede ser una explicación para los OFR más bajos en esas muestras. En el caso de los anillos internos (anillos 9 y 10 en la Figura 3A), la razón que podría explicar la presencia

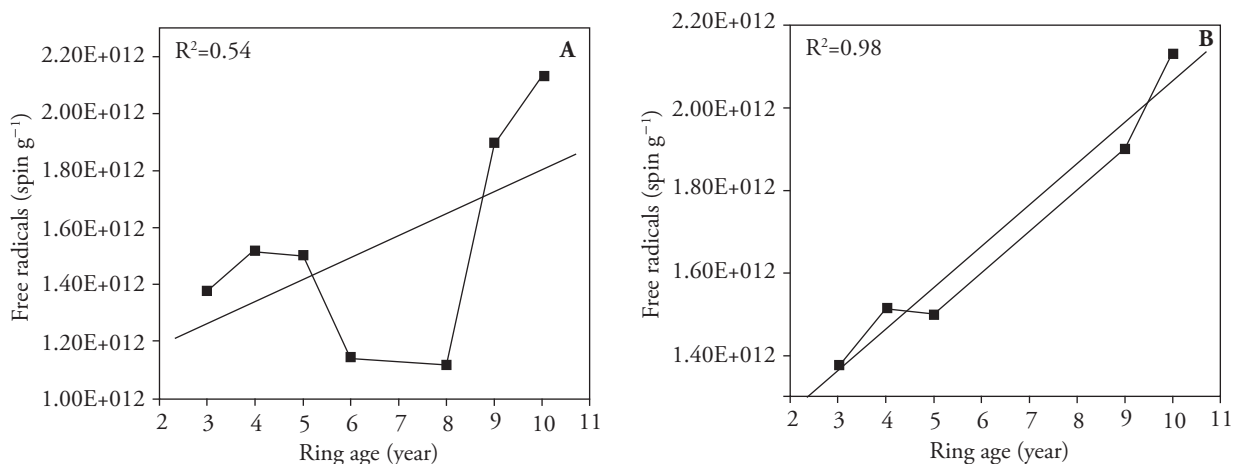


Figure 3. (A) Free radicals concentration along the rings of *Gmelina arborea* and, (B) the central tendency calculated without middle rings.

Figura 3. (A) Concentración de radicales libres en los anillos de *Gmelina arborea* y, (B) tendencia central calculada sin anillos intermedios.

are opposed phenomena that induce the formation of radicals in outer rings such as the incidence of UV-VIS light (Kalnin *et al.*, 1966), and even the indirect exposition to visible light increases the amount of free radicals in wood (Kalnin *et al.*, 1966). In our study, free radicals were found in the outer rings (rings 3-5, Figure 3A), which are not hermetic systems; thus, the diffusion of compounds with the ability to quench radicals from rings in the middle of the stem, (rings 6 and 8, Figure 3A), can be an explanation for the lower OFR in those samples. In the case of the inner rings (rings 9 and 10 in Figure 3A), the reason that could hold the presence of the highest amount of radicals is that those rings retain oldest and dead mater formed by metabolism products such as semiquinone structures (Starr and Taggart, 2008).

Additional information appeared when the amount of radicals in the rings was compared with the carbon content of the same rings reported previously (Marcene *et al.*, 2006). When both values were plotted, an inverse relationship between them was detected (Figure 4). It is remarkable that the carbon content is the highest between rings 3 and 5, where the amount of OFR is the lowest, whereas the carbon content is lower in rings 9 and 10 with a larger amount of OFR. An explanation for these responses could be that in samples with lower carbon content there is higher content of oxygen, which has more ability to stabilize OFR. Although between rings 6 and 8 the tendency is disrupted, the extremes

de la más alta cantidad de radicales es que esos anillos retienen materia más vieja y materia muerta formada por los productos del metabolismo, tales como las estructuras de semiquinonas (Starr y Taggart, 2008).

Nueva información surgió cuando la cantidad de radicales en los anillos se comparó con el contenido de carbono de los mismos anillos reportados anteriormente (Marcene *et al.*, 2006). Cuando se trazaron ambos valores, se detectó una relación inversa entre ellos (Figura 4). Es notable que el contenido de carbono es más alto entre los anillos 3 y 5, donde la cantidad de OFR es la más baja, mientras que el contenido de carbono es menor en los anillos 9 y 10, donde hay una mayor cantidad de OFR. Una explicación a esta tendencia podría ser que en las muestras con menor contenido de carbono hay un mayor contenido de oxígeno, que tiene más capacidad de estabilizar los OFR. Aunque entre los anillos 6 y 8 esta tendencia se interrumpe, los extremos sugieren que la relación inversa podría utilizarse para determinar rápidamente el contenido de carbono con un análisis de EPR simple y fácil, pero es necesario realizar más experimentos con un número mayor de muestras para probar este fenómeno.

Radicales libres orgánicos en *Araucaria angustifolia*

Las mediciones de EPR en las muestras de *A. angustifolia* se utilizaron para comparar el perfil de

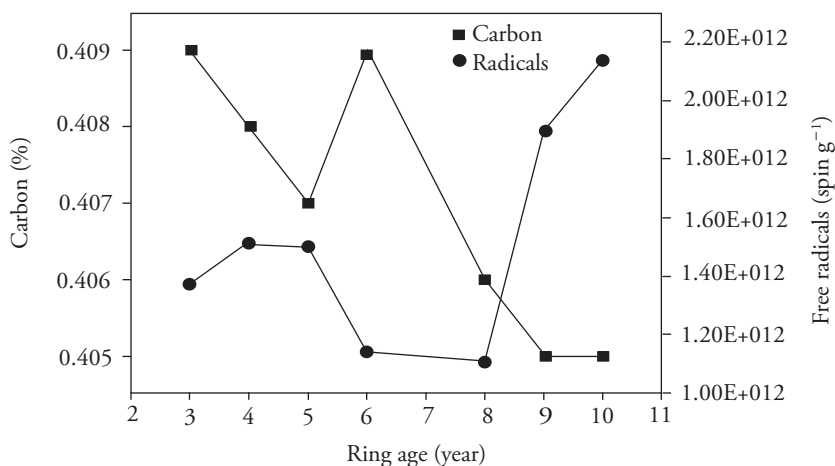


Figure 4. Free radicals and carbon content along different rings of *Gmelina arborea*. The carbon values were taken from a study by Marcene *et al.* (2006).

Figura 4. Radicales libres y contenido de carbono en los diferentes anillos de *Gmelina arborea*. Los valores de carbono fueron tomados de un estudio realizado por Marcene *et al.* (2006).

suggest that the inverse relationship could be used to perform a fast determination of carbon content with a simple and easy EPR analysis, but additional experiments with a larger number of samples must be carried out in order to prove this response.

Organic free radicals in *Araucaria angustifolia*

The EPR measurements on the *A. angustifolia* samples were used to compare the organic free radicals concentration profile with that of *G. arborea*. The concentration of OFR in the samples of *A. angustifolia* was calculated also from the spectra (Figure 5) and results are listed in Table 2.

The values of the g factor are practically the same as those found in *G. arborea* and the EPR signal can be associated to semiquinone structures, as it was described for *G. arborea*. At first sight, the dispersion of the values shows no correlation between the free radical concentration profiles in the rings of *A. angustifolia* (Figure 6A) with the age of the rings ($R^2=0.17$), as if there were irregularity in the composition of the rings or diffusion of compounds between them. However, if the extreme results for rings 3, 4, 7, 8 and 12 are discarded, the new graph (Figure 6B) will show a linear trend similar to that found in *G. arborea* ($R^2=0.94$), where the concentration in inner (*i.e.* older) rings is higher with a radical concentration around 2×10^{12} spin g^{-1} , whereas the outer rings (1 and 2) contain 2×10^{11} spin g^{-1} , which a difference of one order of magnitude. This could be explained with the same argument used previously for *G. arborea*, *i.e.*, the low amount of radicals in the outer rings (1 and 2) can be associated

concentración de los radicales libres orgánicos con el de *G. arborea*. La concentración de OFR en las muestras de *A. angustifolia* se calculó también de los espectros (Figura 5) y los resultados están en el Cuadro 2.

Los valores del factor g son prácticamente los mismos que los encontrados en *G. arborea* y la señal de EPR puede estar asociada a las estructuras de semiquinona, como se describió para *G. arborea*. A primera vista, la dispersión de los valores no muestra correlación de los perfiles de concentración de los radicales libres en los anillos de *A. angustifolia* (Figura 6A) con la edad de los anillos ($R^2=0.17$), como si hubiera una irregularidad en la composición de la anillos o difusión de los compuestos entre ellos. Sin embargo, si se descartan los resultados extremos para los anillos 3, 4, 7, 8 y 12, la nueva gráfica (Figura 6B) mostrará una tendencia lineal similar a la encontrada en *G. arborea* ($R^2=0.94$), en donde la concentración en los anillos internos (es decir, de más años) es mayor, con una concentración radical de alrededor de 2×10^{12} spin g^{-1} , mientras que los anillos exteriores (1 y 2) contienen 2×10^{11} spin g^{-1} , que es una diferencia de un orden de magnitud. Esto podría explicarse con el mismo argumento utilizado anteriormente para *G. arborea*, es decir, la baja cantidad de radicales en los anillos externos (1 y 2) puede estar relacionada con los mecanismos de regulación favorecidos por la actividad metabólica en la región externa.

Muestras de *Araucaria angustifolia* de la era del Pleistoceno

Con el objetivo de relacionar la concentración de radicales libres en las muestras de *A. angustifolia* que

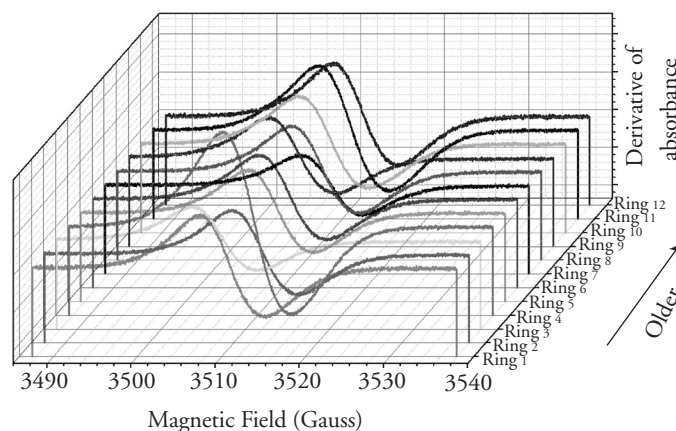


Figure 5. EPR spectra of the rings extracted from the log of *Araucaria angustifolia*.

Figura 5. Espectros de EPR de los anillos extraídos del tronco de *Araucaria angustifolia*.

Table 2. Concentration of free radicals and EPR g factors along the rings of the *Araucaria angustifolia* tree.

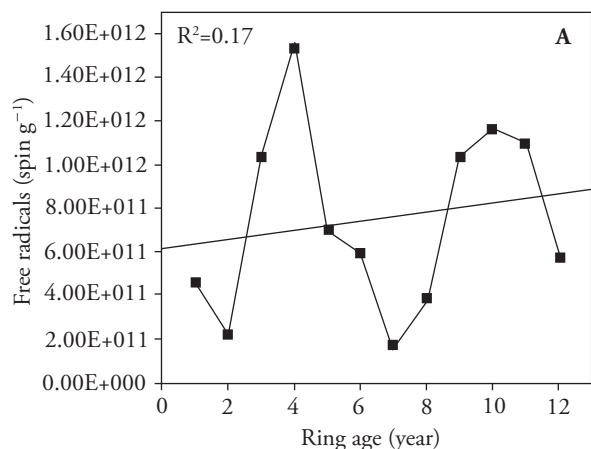
Cuadro 2. Concentración de los radicales libres y factores g en los anillos del árbol de *Araucaria angustifolia*.

Ring age (years)	g factor	Radicals (spin g ⁻¹)
1	2.0042	4.62 x 10 ¹¹
2	2.0047	2.23 x 10 ¹¹
3	2.0047	1.05 x 10 ¹²
4	2.0047	1.56 x 10 ¹²
5	2.0047	7.01 x 10 ¹¹
6	2.0047	5.92 x 10 ¹¹
7	2.0045	1.68 x 10 ¹¹
8	2.0047	3.78 x 10 ¹¹
9	2.0047	1.04 x 10 ¹²
10	2.0047	1.17 x 10 ¹²
11	2.0048	1.09 x 10 ¹²
12	2.0047	5.72 x 10 ¹¹

to regulatory mechanisms favored by the metabolic activity in the external region.

***Araucaria angustifolia*
samples from pleistocene age**

With the aim to relate the concentration of free radicals in the samples of *A. angustifolia* listed in Table 2 with different specimens, two additional samples were analyzed by EPR corresponding to a recent cultivated *Araucaria* and one found from the Pleistocene, both without separating the rings but mixing all of them.



aparecen en el Cuadro 2 con diferentes especímenes, se analizaron con EPR dos muestras adicionales, una correspondiente a una *Araucaria* cultivada recientemente y la otra que data del Pleistoceno; en ambas no se separaron los anillos, sino que se mezclaron todos.

Los resultados en el Cuadro 3 indican que la *A. angustifolia* cultivada recientemente tiene 1.64x10¹¹ spin g⁻¹, que es un valor bajo, pero coincide con el orden de magnitud que hay en los diferentes anillos (Cuadro 2), y que podría ser un valor de referencia para las muestras recientes. Además, la concentración de los radicales en la muestra del Pleistoceno se eleva a 2.30x10¹³ spin g⁻¹, y no está dentro de los valores medios encontrados en muestras recientes. Esta información lleva a inferir que la espectrometría de EPR sería una técnica cualitativa para mostrar, en poco tiempo, las diferencias entre las antiguas y las nuevas muestras de árboles de *A. angustifolia*.

CONCLUSIONES

Los radicales libres que se encuentran en *Gmelina arborea* corresponden a estructuras de semiquinonas, de acuerdo con los valores del factor g de espectroscopia EPR. La concentración de los OFR en las muestras analizadas es mayor en los anillos internos (de más edad). Aunque los anillos externos están expuestos a la luz que induce la formación de radicales libres, las reacciones continuas del metabolismo reducen el número de radicales. La cantidad de radicales libres tuvo una relación inversa con el contenido de carbono en los anillos internos y externos. Esto sugiere

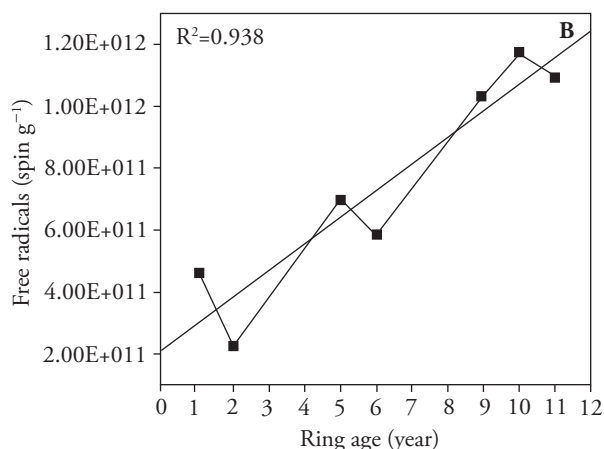


Figure 6. A) Free radicals concentration along the rings of *A. angustifolia* and, B) central tendency calculated without extreme values.

Figura 6. A) Concentración de radicales libres en los anillos de *A. angustifolia* y, B) tendencia central calculada sin los valores extremos.

The results in Table 3 indicate that the recently cultivated *A. angustifolia* has 1.64×10^{11} spin g^{-1} , which is a low value but it matches with the order of magnitude found in the different rings (Table 2) that could be a reference value for recent samples. Besides, the concentration of radicals in the sample of the Pleistocene rises to 2.30×10^{13} spin g^{-1} , and it is not within the mean values found for recent samples. This information leads to infer that the EPR spectrometry would be a qualitative technique for showing, in a short time, differences between old and new samples of *A. angustifolia* trees.

CONCLUSIONS

The free radicals found in *Gmelina arborea* correspond to semiquinone structures, according to the EPR spectroscopy g factor values. The concentration of the OFR in the samples analyzed is higher in inner (older) rings. Although outer rings are exposed to light that induces formation of free radicals, the continuous metabolism reactions reduces the number of radicals. The free radicals amount had an inverse relationship with the carbon content in the inner and outer rings. This suggests that the EPR spectroscopy, using specific quality control equipment such as Bruker e-scan EPR systems, could be a fast method for a qualitative determination of carbon content in wood. But further analysis should be carried out with a larger number of specimens in order to establish the exact relationship between these two parameters.

Regarding the recently cultivated and the Pleistocene *Araucaria angustifolia* samples, the concentration of free radicals along the rings is more disperse. However, the inner (older) rings have a higher amount of radicals than outer rings, similar to the profile found in *G. arborea*. The concentration of free radicals in this sample of *A. angustifolia* was one order of magnitude higher than the values found in the recently cultivated specimen. Finally, the amount of radicals in the recent specimen fell in the range of free radicals concentration found in the *Araucaria* sample studied along different rings, suggesting that EPR spectroscopy could be used to qualitatively estimate the age of the tree from which a wood sample is taken.

Table 3. Concentration of free radicals and g factors in samples of a recently cultivated *A. angustifolia* tree and a sample found from the Pleistocene.

Cuadro 3. Concentración de los radicales libres y factores g en muestras de un árbol de *A. angustifolia* recientemente cultivado y una muestra encontrada que data del Pleistoceno.

Sample	g factor	Radicals (spin g^{-1})
Recent	2.0041	1.64×10^{11}
Pleistoceno	2.0042	2.30×10^{13}

que la espectroscopia EPR, utilizando equipo con control de calidad específico, como los sistemas de EPR e-Scan de Bruker, podría ser un método rápido para una determinación cualitativa del contenido de carbono en la madera. Pero es necesario realizar análisis con un mayor número de especímenes para establecer la relación exacta entre estos dos parámetros.

En relación a las muestras recientemente cultivadas de *Araucaria angustifolia* y las correspondientes al Pleistoceno, la concentración de los radicales libres en los anillos es más dispersa. Sin embargo, los anillos internos (de más años) tienen una mayor cantidad de radicales que los anillos externos, similares al perfil encontrado en *G. arborea*. La concentración de radicales libres en esta muestra de *A. angustifolia* fue de una magnitud superior a los valores encontrados en el espécimen recientemente cultivado. Finalmente, la cantidad de radicales en el espécimen reciente cayó en el rango de concentración de los radicales libres encontrados en la muestra de *Araucaria* estudiada en los diferentes anillos, lo que sugiere que la espectroscopia EPR podría utilizarse para estimar cualitativamente la edad del árbol desde el cual se toma una muestra de madera.

—Fin de la versión en Español—

---*---

ACKNOWLEDGMENTS

To Ronny Rocha Ribeiro for providing assistance for the EPR measurements.

LITERATURE CITED

- Angelo, L. C., A. S. Mangrich, K. M. Mantovani, and S. S. dos Santos. 2013. Loading of VO²⁺ and Cu²⁺ to partially oxidized charcoal fines rejected from Brazilian metallurgical industry. *J Soils Sediments*. Published on-line: 21 August 2013.
- Budziak, C. R., C. M. B. F. Maia, e A. S. Mangrich. 2004. Transformações químicas da matéria orgânica durante a compostagem de resíduos da indústria madeireira. *Quim. Nova* 27: 399-403.
- Câmara, S., B. C. Gilbert, R. J. Méier, M. Van Duin, and A. C. Whitwood. 2006. EPR studies of peroxide decomposition, radical formation and reactions relevant to cross-linking and grafting in polyolefins. *Polymer* 47: 4683-4693.
- Czechowski, F., I. Golonka, and A. Jezierski. 2004. Organic matter transformation in the environment investigated by quantitative electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy: studies on lignins. *Spectrochim. Acta Part A* 60: 1387-1394.
- Guedes, C. L. B., E. di Mauro, V. Antunes, and A. S. Mangrich. 2003. Photochemical weathering study of Brazilian petroleum by EPR spectroscopy. *Mar. Chem.* 84: 105-112.
- Hon, D. N. S., and W. C. Feist. 1981. Free radical formation in wood: the role of water. *Wood Sci.* 14: 41-44.
- Hon, D. N. S., G. Ifju, and W. C. Feist. 1980. Characteristics of free radicals in wood. *Wood and Fiber* 12: 121-130.
- Humar, M., A. Straze, M. Sentjurc, and F. Pohleven F. 2006. Influence of wood moisture content on the intensity of free radicals EPR signal. *Holz als Roh- und Werkstoff* 64: 515-516.
- Joannes-Boyau, R., and R. Grün. 2011. A comprehensive model for CO₂- radicals in fossil tooth enamel: Implications for ESR dating. *Quat. Geochronol.* 6: 82-97.
- Illman, B. L., and S. Bajt. 1997. Nondestructive elemental analysis of wood biodeterioration using electron paramagnetic resonance and synchrotrons X-ray fluorescence. *Int. Biodeterioration Biodegradation* 39: 235-242.
- Kalnins, M. A., C. Steelink, and H. Tarkow. 1966. Light-induced free radicals in wood. U. S. Forest Service Research Paper fpl 58.
- Kinoshita, A., A. Barreto, R. Alves, A. Maria Figueiredo, J. Eduardo de Souza Sarkis, M. L. Dias, and O. Baffa. 2008. ESR dating of teeth from northeastern Brazilian megafauna. *Radiat. Meas.* 43: 809-812.
- Krakowian, D., D. Skiba, A. Kudelski, B. Pilawa, P. Ramos, J. Adamczyk, and K. Pawłowska-Góral. 2014. Application of EPR spectroscopy to the examination of pro-oxidant activity of coffee. *Food Chem.* 151:110-119.
- Lee, S. Y., J. F. Copeland, G. E. Chabot, and K. P. Gall. 2000. ESR dosimetry of human cortical bone irradiated by a therapeutic proton beam. *Proc. 22nd Ann. EMBS Int. Conf., Chicago.* 147-150.
- Mangrich, A. S., L. Silva, B. F. Pereira, and I. Messerschmidt. 2009. Proposal of an EPR based method for pollution level monitoring in mangrove sediments. *J. Braz. Chem. Soc.* 20: 294-298.
- Marcene E. A., A. P. D. Corte, C. R. Sanquetta, and C. R. Schneider. 2006. Changes in carbon content and individual stock as related to growth of *Gmelina arborea* Roxb. in the Paraná Coastal region, Brazil. *Scientia Forestalis* 71: 55-63.
- McCune, L. M., and T. Johns. 2007. Antioxidant activity relates to plant part, life form and growing condition in some diabetes remedies. *J. Ethnopharmacol* 112: 461-469.
- Oliveira, J. M., V. D. Pillar, e F. A. Roig. 2007. Padrões de idade e crescimento de *Araucaria angustifolia*: reconstruindo históricos de distúrbio e dinâmica vegetacional. VIII Congresso Ecol. do Brasil, Caxambu, Brasil. Resumen 1804.
- Pryor, W. A. 1992. Biological effects of cigarette smoke, wood smoke, and the smoke from plastics: the use of electron spin resonance. *Free Radical Biol. Med.* 13: 659-676.
- Ribeiro, M. V., S. Deuner, L. C. Benítez, A. M. Einhardt, J. A. Peters, and E. J. B. Braga. Betacyanin and antioxidant system in tolerance to salt stress in *Alternanthera philoxeroides*. *Agrociencia* 48:199-210.
- Rocha-Guzmán, N. E., J. A. Gallegos-Infante, R. F. González-Laredo, M. Ramos-Gómez, M. E. Rodríguez-Muñoz, R. Reynoso-Camacho, A. Rocha-Urbe, and M. R. Roque-Rosales. 2007. Antioxidant effect of oregano (*Lippia berlandieri* v. Shauer) essential oil and mother liquors. *Food Chem.* 102: 330-335.
- Rocha-Guzmán, N. E., J. A. Gallegos-Infante, R. F. González-Laredo, R. Reynoso-Camacho, M. Ramos-Gómez, T. García-Gasca, M. E. Rodríguez-Muñoz, S. H. Guzmán-Maldonado, L. Medina-Torres, and B. A. Lujan-García. 2009. Antioxidant activity and genotoxic effect on HeLa cells of phenolic compounds from infusions of *Quercus resinosa* leaves. *Food Chem.* 115: 1320-1325.
- Sithisarn, P., R. Supabphol, and W. Gritsanapan. 2005. Antioxidant activity of Siamese neem tree (VP1209). *J Ethnopharmacol.* 99: 109-112.
- Starr, C., y R. Taggart. 2008. *Biología: La Unidad y Diversidad de la Vida*, 11th ed., México: Cengage Learning. 1064 p.
- Triantafyllou, M., P. Papachristodoulou, and A. Pournou. 2010. Wet charred wood: a preliminary study of the material and its conservation treatments. *J. Archaeol. Sci.* 37, 2277-2283.
- Yen, T. F., J. G. Erdman, and A. J. Saraceno. 1962. Investigation of the nature of free radicals in petroleum asphaltenes and related substances by electron spin resonance. *Anal. Chem.* 34: 694-700.
- Zhou, G., J. Li, Y. Chen, B. Zhao, Y. Cao, X. Duan, and Y. Cao. 2009. Determination of reactive oxygen species generated in laccase catalyzed oxidation of wood fibers from Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) by electron spin resonance spectrometry. *Bioresource Technol.* 100: 505-508.