

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Caroline Dohanik da Silva

**PROSPECÇÃO DE INIBIDORES DE UREASES PROMISSORES PARA
OTIMIZAÇÃO DE FERTILIZANTE NITROGENADO**

Belo Horizonte
2020

Caroline Dohanik da Silva

**PROSPECÇÃO DE INIBIDORES DE UREASES PROMISSORES PARA
OTIMIZAÇÃO DE FERTILIZANTE NITROGENADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial a obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Gisele Assis Castro Goulart

Coorientadoras: Profa. Dra. Luzia Valentina Modolo

Profa. Dra. Rachel Oliveira Castilho

Belo Horizonte
2020

S586p Silva, Caroline Dohanik da.
Prospecção de inibidores de ureases promissores para otimização de fertilizante nitrogenado [recurso eletrônico] / Caroline Dohanik da Silva. – 2020.

1 recurso eletrônico (81 f. : il.) : pdf

Orientadora: Gisele Assis Castro Goulart.
Coorientadoras: Luiza Valentina Modolo.
Rachel Oliveira Castilho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Farmacêuticas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Aminas – Teses. 2. Urease – Teses. 3. Ureia – Teses. 4. Compostos orgânicos – Teses. 5. Compostos organofosforados – Teses. I. Goulart, Gisele Assis Castro. II. Modolo, Luiza Valentina. III. Castilho, Rachel Oliveira. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.

CDD: 631.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DA ALUNA CAROLINE DOHANIK DA SILVA

Realizou-se, no dia 20 de fevereiro de 2020, às 14:00 horas na sala 3062 B3 da Faculdade de Farmácia-UFMG, a 339ª defesa de dissertação, intitulada PROSPECÇÃO DE INIBIDORES DE UREASES PROMISSORES PARA OTIMIZAÇÃO DE FERTILIZANTE NITROGENADO, apresentada por CAROLINE DOHANIK DA SILVA, número de registro 2018658160, graduada no curso de FARMÁCIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, à seguinte Comissão Examinadora: Profa. Gisele Assis Castro Goulart - Orientadora (UFMG), Profa. Luzia Valentina Modolo - Coorientadora (UFMG), Profa. Rachel Oliveira Castilho - Coorientadora (UFMG), Prof. André Augusto Gomes Faraco (UFMG), Dra. Cristiane Jovelina da Silva (UFPEL).

A Comissão considerou a tese:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.



Documento assinado eletronicamente por **Andre Augusto Gomes Faraco, Professor do Magistério Superior**, em 19/05/2021, às 16:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gisele Assis Castro Goulart, Professora do Magistério Superior**, em 20/05/2021, às 05:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luzia Valentina Modolo, Professora do Magistério Superior**, em 20/05/2021, às 18:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rachel Oliveira Castilho, Professora do Magistério Superior**, em 24/05/2021, às 16:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cristiane Jovelina da Silva, Usuário Externo**, em 15/09/2023, às 13:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0734525** e o código CRC **F1A17843**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por sempre me guiar por bons caminhos e colocar neles pessoas que contribuem para minha jornada.

Aos meus pais, Célia e Washington, que sempre me deram uma boa estrutura familiar. Me deram muito amor e carinho e sempre me ensinaram quais são as coisas mais importantes na vida. Além disso, agradeço a eles por nunca terem medido esforços para me desenvolver educacionalmente, mesmo que necessitasse de muito sacrifício para isso.

Ao meu companheiro Paulo, com quem eu me perco no mundo da ciência e da criação. Obrigada pelo apoio, por estar sempre ao meu lado e pela admiração.

Agradeço imensamente à minha orientadora, Profa. Gisele, que é uma pessoa incrível, com quem tive a oportunidade de trabalhar. Obrigada por contribuir para o meu crescimento profissional e pessoal, por acreditar que eu posso ir além da minha capacidade, por toda a positividade, pelo incentivo, pelo carinho e pelo trabalho realizado. Foi uma honra trabalhar com você.

Agradeço também às minhas coorientadoras, Profa. Luzia e Profa. Rachel, por todo apoio durante meu trabalho, pelos ensinamentos fornecidos e por serem reforços positivos na minha profissão.

Agradeço ao Prof. Ângelo de Fátima, do Departamento de Química da UFMG, pelo apoio e pelas substâncias sintetizadas; e ao Prof. Thiago de Aquino (UFAL), pela contribuição com o estudo de *docking* molecular.

Agradeço aos alunos Breno Germano e Thamara Silva, do Departamento de Química e ICB (UFMG), respectivamente, pelo auxílio nos mais diversos experimentos, troca de ideias, companheirismo e por vislumbrar um objetivo em comum. Agradeço também a aluna Bruna Rodrigues, que foi meu braço direito durante todo o mestrado e em quem tenho extrema confiança. Obrigada pelo apoio de vocês.

Agradeço aos grupos de estudos GeBioPlan e GeQOB, que me receberam como se eu fosse membro, e ao LTF (Laboratório de Tecnologia Farmacêutica), ao qual eu pertencço. Obrigada pelas conversas, troca de ideais e companhias.

“Educação não transforma o mundo.

Educação muda as pessoas.

Pessoas transformam o mundo.”

(Paulo Freire)

RESUMO

A ureia é o fertilizante nitrogenado mais utilizado na agricultura. Porém, perdas por volatilização da amônia, decorrentes da ação da enzima urease, acarretam problemas econômicos e ambientais. Uma das estratégias para prevenir essa perda é a utilização de inibidores da urease, sendo o *N*-(butil) tiofosfórica triamida (NBPT) o inibidor mais utilizado comercialmente. No entanto, o NBPT apresenta limitações importantes, como baixa estabilidade em temperaturas elevadas, menor eficiência em solos ácidos e, por ser um produto importado, onera a produção agrícola brasileira, levando à necessidade de desenvolvimento de novos inibidores de urease. Neste trabalho, duas bases de Schiff, 3B4 e 3D6, e uma amina derivada da substância 3B4, foram melhor estudadas com o objetivo de obter uma formulação capaz de veicular esses inibidores. Estudos de solubilidade foram conduzidos e mostraram que os inibidores de urease propostos são praticamente insolúveis em água, necessitando do auxílio de solventes e cossolventes para a solubilização. Uma formulação segura foi desenvolvida com o intuito de verificar a segurança dessas substâncias em estudos de fitotoxicidade utilizando sementes de alface (*Lactuca sativa* L.). A avaliação da inibição da atividade antiureolítica em solo foi conduzida e mostrou que a substância 3B4 ($55 \pm 4\%$) foi o inibidor de urease mais promissor em comparação com a substância 3D6 ($39 \pm 7\%$) e 3B4a ($28 \pm 11\%$), sem diferença estatística do NBPT ($50 \pm 1\%$, $p > 0,05$). No entanto, no estudo de inibição da urease *in vitro* não foi observada diferença estatística entre a substância 3B4 ($23 \pm 7\%$) e sua amina (3B4a, $24 \pm 10\%$); e o estudo de *docking molecular* mostrou que a interação entre a substância 3B4a e a enzima urease resultou em um complexo mais estável. A avaliação da interação das misturas 3B4:ureia (1:1) e 3B4a:ureia (1:1) utilizando espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier não mostrou evidências de interações nos tempos 0, 24 e 48h. O conjunto dos dados fornecem indícios de que a base Schiff 3B4 e sua amina (3B4a) são promissoras candidatas a aditivos para estudos adicionais como inibidores da urease.

Palavras-chave: amina; bases de Schiff; formulação; inibidores de urease; NBPT; ureia.

ABSTRACT

Urea is the most widely used nitrogen fertilizer in agriculture. However, losses due to ammonia volatilization, resulting from the action of the urease enzyme, cause economic and environmental problems. One of the strategies to prevent this loss is the use of urease inhibitors, with *N*-(butyl) thiophosphoric triamide (NBPT) being the most commercially used inhibitor. However, NBPT has important limitations, such as low stability at high temperatures, less efficiency in acid soils and, as it is an imported product, it burdens Brazilian agricultural production, leading to the need to develop new urease inhibitors. In this work, two Schiff bases, 3B4 and 3D6, and an amine derived from the substance 3B4, were better studied with the aim of obtaining a formulation capable of carrying these inhibitors. Solubility studies were conducted and showed that the proposed urease inhibitors are practically insoluble in water, requiring the aid of solvents and co-solvents for solubilization. A safe formulation was developed to verify the safety of these substances in phytotoxicity studies using lettuce seeds (*Lactuca sativa* L.). Evaluation of inhibition of antiureolytic activity in soil was conducted and showed that substance 3B4 ($55 \pm 4\%$) was the most promising urease inhibitor compared to substance 3D6 ($39 \pm 7\%$) and 3B4a ($28 \pm 11\%$), with no statistical difference from the NBPT ($50 \pm 1\%$, $p > 0.05$). However, in the *in vitro* urease inhibition study, no statistical difference was observed between substance 3B4 ($23 \pm 7\%$) and its amine (3B4a, $24 \pm 10\%$); and the molecular docking study showed that the interaction between the 3B4a substance and the urease enzyme resulted in a more stable complex. The evaluation of the interaction of the 3B4:urea (1:1) and 3B4a:urea (1:1) mixtures using Fourier transform infrared spectroscopy showed no evidence of interactions at times 0, 24 and 48h. The data set provide indications that Schiff base 3B4 and its amine (3B4a) are promising candidates for additives for further studies as urease inhibitors.

Keywords: amine; Schiff bases; formulation; urease inhibitors; NBPT; urea.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 Importância do N para a agricultura	13
2.2 Processos de perdas do N do solo	14
2.2.1 Lixiviação.....	15
2.2.2 Desnitrificação.....	15
2.2.3 Volatilização da amônia.....	16
2.3 Ureia e a enzima urease	17
2.4 Impactos econômicos e socioambientais da perda de N	21
2.4.1 Impactos econômicos.....	21
2.4.2 Impactos socioambientais.....	22
2.5 Desenvolvimento sustentável da agricultura	24
2.6 Estratégias para aumentar a eficiência da ureia na agricultura	24
2.6.1 Fertilizantes de liberação lenta ou controlada.....	25
2.6.2 Inibidores de nitrificação.....	26
2.6.2 Inibidores de urease.....	26
2.7 Bases de Schiff como inibidores de urease	29
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
4 DESENVOLVIMENTO	34
Prospection of Promising Urease Inhibitors for the Optimization of a Nitrogen Fertilizer	34
1 INTRODUCTION	35
2 EXPERIMENTAL SECTION	38
2.1 Solubility and Polarized light microscopy.....	38
2.2 Evaluation of urease inhibition in soil.....	38
2.3 Evaluation of urease inhibition in vitro.....	40
2.4 Molecular Docking.....	40
2.5 Evaluation of the interaction between 3B4 and 3B4a with urea.....	42

2.6 Development of a safe formulation to carry the urease inhibitors.....	42
2.7 Seed germination	43
2.8 Statistical analysis	44
3 RESULTS AND DISCUSSION	45
3.1 Solubility and Polarized light microscopy.....	45
3.2 Evaluation of urease inhibition in soil and in vitro	51
3.3 Molecular docking.....	52
3.4 Interaction between 3B4 and urea.....	53
3.5 Development of a safe formulation to convey urease inhibitors in germination test	55
3.6 Assessment of the safety of formulations without urease inhibitors on seed germinations	57
4 CONCLUSION	65
SUPPORTING INFORMATION	65
ABBREVIATIONS.....	65
FUNDING SOURCES.....	66
REFERENCES	66
5 CONCLUSÃO GERAL.....	74
REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

A utilização de fertilizantes nitrogenados é primordial para manter e aumentar a produtividade agrícola (SMITH, *et al.*, 1990; ROTHSTEIN, 2007). O nitrogênio (N) é um dos elementos essenciais para as plantas, participando da constituição de várias moléculas importantes, como aminoácidos, amidas, proteínas e ácidos nucleicos; além de participar na síntese da clorofila (TAIZ *et al.*, 2017; OHYAMA, 2010). No entanto, apesar de ser encontrado em grande quantidade na atmosfera, o N não está disponível biologicamente para a maioria dos organismos, sendo os fertilizantes nitrogenados uma das formas de fornecê-lo às plantas (GALLOWAY e COWLING, 2002; KLUTHCOUSKI, 2006).

Contudo, os fertilizantes nitrogenados estão susceptíveis a perdas através da erosão, escoamento, desnitrificação, lixiviação, volatilização e imobilização biológica (SMITH, *et al.*, 1990; NEETESON e CARTON, 2001; YAMADA e ABDALLA, 2000; CANTARELLA, 2007; CHEN *et al.*, 2008). Entre os fertilizantes nitrogenados a ureia se destaca devido ao elevado conteúdo de N (46% N) e baixo custo de produção (CANTARELLA, 2007; KRAJEWSKA, 2009; TRENKEL, 2010; CANTARELLA *et al.*, 2018). Porém, a ureia está susceptível à perdas por volatilização da amônia, que são intensificadas em países tropicais, como o Brasil, onde há o predomínio de temperaturas altas (FRAZÃO *et al.*, 2014; TRENKEL, 2010). A perda de amônia da ureia está relacionada à sua hidrólise, que ocorre devido à atividade da enzima urease (ZANIN *et al.*, 2015). As ureases constituem um grupo de enzimas que ocorre em plantas, bactérias, fungos, algas e invertebrados (KRAJEWSKA, 2009). O resultado da hidrólise da ureia é a formação de amônio e dióxido de carbono. O amônio pode ficar na forma de íon, ou ser volatilizado na forma de amônia (ZANIN *et al.*, 2015).

Para minimizar a ação da urease e as perdas associadas são utilizados produtos que diminuem a taxa de liberação de nutrientes dos fertilizantes, como fertilizantes de liberação lenta\controlada; ou produtos que interferem no processo de transformação de nutrientes, como inibidores de nitrificação e inibidores de urease (AKIYAMA *et al.*, 2010; TRENKEL, 2010; YADAV *et al.*, 2017). Dentre esses inibidores de urease, o *N*-(butil) tiofosfórica triamida (NBPT), um análogo estrutural

da ureia, é atualmente o mais eficaz e utilizado (WATSON *et al.*, 2000; CANTARELLA *et al.*, 2018). Contudo, estudos têm mostrado instabilidade térmica do NBPT em temperaturas superiores 25° C (WATSON *et al.*, 2008; CANTARELLA *et al.*, 2016), menor eficácia em solos ácidos (ENGEL *et al.*, 2013; SAN FRANCISCO *et al.*, 2011) e, por ser um produto importado, gera custos elevados para produção agrícola brasileira (MODOLO *et al.*, 2016). Adicionalmente, em culturas de milho foram observadas alteração no influxo e na assimilação da ureia (ZANIN *et al.*, 2015). Assim, o desenvolvimento de inibidores de urease eficazes em baixas concentrações, não tóxicos para plantas e ambiente, estáveis, acessíveis economicamente e compatíveis com a ureia constituem uma demanda (WATSON *et al.*, 2008; ARTOLA *et al.*, 2011).

Dentre os novos inibidores em estudo, há as bases de Schiff, formadas a partir da reação de uma amina primária com um aldeído ou cetona em condições específicas (DA SILVA *et al.*, 2011; KALAIVANI *et al.*, 2012). Essa classe tem sido associada a potentes efeitos antiureolíticos (DE FÁTIMA *et al.*, 2018; MODOLO *et al.*, 2016). Dentre as 71 substâncias sintetizadas pela Redniu (Rede de Desenvolvimento de Novos Inibidores de Urease), duas (3B4 e 3D6) foram selecionadas para serem melhor estudadas neste trabalho. As bases de Schiff apresentaram resultados promissores no teste *in vitro* de inibição da urease e na avaliação da inibição da urease em solo (CHAVES-SILVA *et al.*, 2020; MODOLO *et al.*, 2016).

Com o objetivo de avançar nos estudos com as substâncias 3B4 e 3D6, neste trabalho foram conduzidos estudos de solubilidade e reatividade; e desenvolvida uma formulação segura para avaliação da fitotoxicidade em sementes de alface (*Lactuca sativa* L.). Adicionalmente, uma amina análoga a uma das bases (3B4a) foi sintetizada e teve sua atividade antiureolítica em solo e *in vitro* determinada. Estudos *in silico* de *docking* molecular também foram realizados para a avaliação da interação das substâncias 3B4 e 3B4a com a enzima urease. Por fim, estudos de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram conduzidos para avaliação da interação das substâncias 3B4 e 3B4a com ureia nos tempos 0, 24 e 48 h.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Importância do N para a agricultura

O gás nitrogênio (N_2) representa cerca de 80% da massa total da atmosfera da Terra. Nessa forma o N não está biodisponível para a maioria dos organismos (GALLOWAY e COWLING, 2002). Devido à sua estabilidade, a disponibilização de N para a natureza advém de processos que envolvem altas temperaturas (como relâmpagos) e transformação por bactérias fixadoras de N, como as do gênero *Rhizobium* (SMIL, 1997; GALLOWAY e COWLING, 2002). Além da fixação realizada pelos procaríotos, o N também é disponibilizado para as plantas através da matéria orgânica do solo, pela reciclagem de culturas anteriores e/ou pela utilização de fertilizantes nitrogenados (KLUTHCOUSKI, 2006).

O N é essencial para as plantas, pois participa da constituição de aminoácidos, amidas, proteínas, ácidos nucleicos, nucleotídeos, coenzimas e hexoaminas; sendo necessário também para a síntese da clorofila (SMITH *et al.*, 1990; TAIZ *et al.*, 2017). No solo o N é encontrado em três formas: N orgânico, que é parte da matéria orgânica do solo; o N amoniacal, que se encontra fixado em minerais argilosos, sendo liberado lentamente; e o N inorgânico, composto por íons amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) ou compostos solúveis (LOPES, 1998). O N na sua forma orgânica é o mais predominante no solo (97- 98% do N total do solo). As formas inorgânicas, que são absorvidas pelos vegetais, são resultado da transformação das formas orgânicas presentes no solo. O processo denominado mineralização consiste na transformação do N orgânico em formas minerais, realizadas por microrganismos heterotróficos do solo, que utilizam substâncias orgânicas como fontes de energia. Já a imobilização, passagem do N mineral para formas orgânicas, é realizada por microrganismos que incorporam o N inorgânico disponível no solo às suas células, utilizando-o para formação de proteínas e tecidos (RAIJ, 1983; LOPES, 1998; CANTARELLA, 2007).

A falta de N e clorofila resulta na inadequada utilização da luz do sol como fonte de energia, interferindo em funções essenciais das plantas, como a absorção de nutrientes. A deficiência de N nas plantas é caracterizada pela inibição do crescimento dos vegetais. Caso a deficiência permaneça, as plantas expressam

clorose (folhas amareladas), especialmente em folhas maduras, próximas à base da planta (**Figura 1**) (TAIZ *et al.*, 2017).

Figura 1- Planta saudável (C) comparada com uma planta com deficiência de N (-N), ocasionando clorose.



Fonte: Adaptado de AQUINO *et al.*, 2019.

Para sustentar os altos rendimentos das culturas, ainda no século passado, buscou-se um método que provesse N em quantidade suficiente. Assim, no início do século XX, o processo de Haber-Bosh possibilitou a síntese industrial da amônia, permitindo o aumento do rendimento das colheitas (SMILL, 2001).

A viabilização da síntese química de fontes de N foi e tem sido tão importante para a humanidade que proporcionou dois prêmios Nobel de química para os pesquisadores Fritz Haber em 1918, pela síntese de amônia a partir de seus elementos (N e hidrogênio) e a Carl Bosch e Friedrich Bergius em 1931, em reconhecimento por suas contribuições para a invenção e o desenvolvimento de métodos químicos de alta pressão (NOBEL PRIZE, 2020).

2.2 Processos de perdas do N do solo

A relação de N no sistema solo-planta-atmosfera é dada pela diferença de ganhos e perdas no sistema. As perdas de N ocorrem através da erosão, escoamento, desnitrificação, lixiviação, volatilização e imobilização biológica (SMITH, *et al.*, 1990; NEETESON e CARTON, 2001; YAMADA e ABDALLA, 2000; CANTARELLA, 2007; CHEN *et al.*, 2008;). A perda de N a partir do sistema solo-planta contribui para a intensificação de problemas ambientais, incluído poluição da água, do solo e do ar (HAWKESFORD *et al.*, 2011).

2.2.1 Lixiviação

A lixiviação é o movimento descendente de N através do perfil do solo. Entre as formas inorgânicas do N, o ânion NO_3^- está mais sujeito ao processo de lixiviação devido à repulsão por partículas do solo predominantemente carregadas negativamente e à baixa interação desse ânion com outros minerais presentes. A lixiviação do NO_3^- tem uma relação direta com a quantidade de água que percola o solo. Porém, existem outros fatores que interferem nessa movimentação do ânion e da água, como as interações físicas e químicas desses dois elementos com o solo, textura do solo, intervalo entre chuvas, solos com horizontes superficiais com carga positiva, mecanismo de mobilidade da água e de NO_3^- no solo, manejo agrônomico do solo, fornecimento de N, entre outros (NEETESON e CARTON, 2001; CANTARELLA, 2007) .

No entanto, alguns estudos apontam que a lixiviação não é um problema crítico, podendo ser evitado por meio do parcelamento da adubação (YAMADA, e ABDALLA, 2000). No Brasil são poucos os casos descritos na literatura de perdas elevadas de N por lixiviação (CANTARELLA, 2007). Em um experimento de balanço de N no sistema solo-planta realizado por Coelho e colaboradores (1991) observou-se que para 60 kg de N/ha aplicados na forma de ureia em um latossolo vermelho-escuro, com cultivo de milho no cerrado, apenas 4% foi perdido por lixiviação. Em outro estudo, Reichardt e colaboradores (1982) mostraram que a lixiviação também não foi um problema para uma taxa de aplicação de 90 kg N/ha, sendo perdido apenas 4,5 g de fertilizante nitrogenado por lixiviação por milímetro de chuva, em condições tropicais.

2.2.2 Desnitrificação

A nitrificação é o processo que transforma o N amoniacal em N-nítrico por bactérias nitrificadoras. Associado ao processo de nitrificação está a desnitrificação, na qual certos microrganismos são capazes de usar NO_2^- ou NO_3^- em substituição a O_2 para formar os gases N_2O (óxido nitroso), NO_2 , N_2 e NO_x , que são perdidos para a atmosfera (LOPES, 1998; NEETESON e CARTON, 2001).

Em determinadas condições ambientais, tais como em áreas alagadas, a disponibilidade de O_2 é limitada. Assim, os microrganismos utilizam NO_2^- ou NO_3^- para realizar a respiração, liberando as formas reduzidas de N para a atmosfera (NEETESON e CARTON, 2001; SEMOKA, 2008). A taxa de desnitrificação depende de alguns fatores, como a umidade, temperatura e aeração do solo e do suprimento de carbono e substrato (NO_2^- ou NO_3^-). Sendo assim, a desnitrificação geralmente ocorre em solos de textura fina e mal drenados, e em situações com lençol freático alto, onde há uma maior probabilidade de as condições anaeróbicas estarem presentes (NEETESON e CARTON, 2001).

A perda de N na forma gasosa provoca a diminuição da eficiência dos fertilizantes nitrogenados, e até 30% do fertilizante nitrogenado aplicado pode ser perdido pelo processo de desnitrificação (AMBER e ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, 2007). Além disso, o N_2O é conhecido por ser um gás causador do efeito estufa, tendo um potencial de aquecimento global 320 vezes maior do que o dióxido de carbono, uma vez que sua vida atmosférica é cerca de 120 anos. O óxido nítrico (NO) também está associado à depleção da camada de ozônio estratosférica da terra, de forma que o balanço radioativo da troposfera contribui para o aquecimento global (NEETESON e CARTON, 2001; MARTENS, 2005; CANTARELLA, 2007).

2.2.3 Volatilização da amônia

A volatilização de amônia representa uma das principais perdas de N (MA *et al.*, 2010); podendo ser oriunda de fertilizantes nitrogenados, excrementos (fezes e urina) de animais e da mineralização da matéria orgânica e de resíduos vegetais (CAMERON *et al.*, 2013). Porém, uma série de fatores interfere neste processo, como a natureza do fertilizante, pH, conteúdo de matéria orgânica, conteúdo de água, temperatura e capacidade de troca iônica do solo (REICHARDT *et al.*, 1982). Esta perda está relacionada ao equilíbrio químico entre o íon amônio (NH_4^+) e a forma gasosa amônia (NH_3) representado na equação $NH_4^+ + OH^- \leftrightarrow NH_3 + H_2O$. Levando-se em consideração a constante de dissociação de $5,85 \times 10^{-10}$ a $20^\circ C$, tem-se que a forma predominante de N em pH ácido é NH_4^+ e à medida que o pH aumenta a porcentagem de NH_3 também aumenta, explicando o aumento da volatilização N- NH_3 em solos alcalinos (CANTARELLA, 2007; CAMERON *et al.*, 2013).

Fertilizantes amoniacais sofrem perdas por volatilização de NH_3 quando aplicados em solos alcalinos (LOPES e GUILHERME, 2000). Mas pouca ou nenhuma perda é observada quando fertilizantes amoniacais de reação ácida ou neutra, como sulfato ou nitrato de amônio, são aplicados a solos neutros ou ácidos. Porém, esses fertilizantes são mais caros, além de o nitrato de amônio ser de uso restrito devido à sua aplicação na fabricação de material explosivo (CANTARELLA, 2007; CANTARELLA *et al.*, 2018). No caso da ureia, a perda de N-NH_3 pode ocorrer tanto em solos ácidos como básicos (FENN e HOSSNER, 1985). Após a aplicação da ureia o pH do solo aumenta de modo acentuado devido à hidrólise, portanto há um aumento na volatilização da amônia (CAMERON *et al.*, 2013).

Em um estudo de avaliação de perdas por volatilização de N-NH_3 da cobertura nitrogenada em uma cultura de milho, Cabezas e colaboradores (1997) testaram cinco fontes de N utilizando o sistema de plantio direto (SPD) e sistema de plantio convencional (SPC). No SPD, as perdas acumuladas de N-NH_3 provenientes de diferentes fontes de N (ureia; uran - nitrato de amônia ureia; sulfuran - adição de sulfato de amônio ao uran) aplicadas na superfície foram, respectivamente, 78,0; 37,2 e 26,9%. No SPC, as perdas mais significativas foram pela aplicação de ureia e uran (30,7% e 9,7%, respectivamente). Assim, o nitrato de amônio e o sulfato de amônio apresentaram perdas inferiores a 15,0%. Esse estudo mostrou que a ureia é o fertilizante mais suscetível à perda de N por volatilização, podendo chegar até 78% de perdas em condições climáticas mais severas. Resultados semelhantes também foram observados por Vitti e colaboradores (2007) em cultura de cana de açúcar com adubos aplicados sobre os resíduos deixados pelo canavial anterior. Nesse estudo a perda de NH_3 por volatilização a partir de diversos fertilizantes nitrogenados também foi maior para a ureia e uran, variando de 37 a 46%. Apesar dessas perdas mais relevantes, devido ao baixo custo relativo de produção e alto teor de N (46% N), a ureia ocupa uma posição de liderança no mercado mundial de fertilizantes nitrogenados (CANTARELLA, 2007; KRAJEWSKA, 2009; TRENKEL, 2010; CANTARELLA *et al.*, 2018).

2.3 Ureia e a enzima urease

A ureia representa mais de 50% do total de fertilizantes nitrogenados utilizados mundialmente sendo estimada uma demanda global de cerca de 184 milhões de

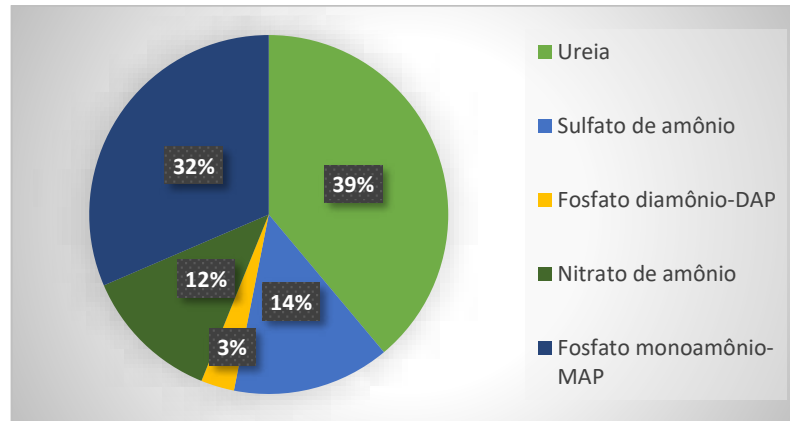
tonelada em 2023 (KRAJEWSKA, 2009; GARSIDE, 2019). Produzida a partir da reação da NH_3 com o CO_2 a um baixo custo relativo de produção e sem a necessidade da utilização de ácidos ou materiais e equipamentos especiais, a ureia apresenta baixo custo de transporte, manuseio, armazenamento e aplicação. Adicionalmente, possui elevada solubilidade, baixa corrosividade, ausência de risco de incêndio e explosão e compatibilidade com diversas outras fontes de suplementação (CANTARELLA, 2007; TRENKEL, 2010; FRAZÃO *et al.*, 2014). No entanto, a principal desvantagem da ureia é a suscetibilidade à volatilização de NH_3 , gerando perdas que são intensificadas em países tropicais, como o Brasil, onde há o predomínio de temperaturas altas (TRENKEL, 2010; FRAZÃO *et al.*, 2014).

No Brasil, o consumo total de N superou 14 milhões de toneladas em 2017, sendo a ureia o fertilizante nitrogenado mais consumido (39%) (**Figura 2**). No entanto, a produção nacional de ureia correspondeu a modestas 836.754 toneladas métricas, levando à necessidade de importação de 4.769.793 de toneladas e uma dependência do país pelo mercado externo de fertilizante (ANDA, 2017). Uma forma de minimizar essa dependência é otimizar a eficiência da ureia, limitando as perdas e os efeitos econômicos e ambientais decorrentes da ação das ureases, visto que a perda de N-NH_3 a partir de ureia está relacionada a hidrólise catalisada por ureases presentes no solo (ZANIN *et al.*, 2015).

As ureases constituem um grupo de enzimas que ocorre em plantas, bactérias, fungos, algas e invertebrados. Apesar de existirem diferenças na estrutura proteica, devido à presença de diferentes tipos de subunidades, essas enzimas exibem elevada homologia na sequência de aminoácidos que compõem o sítio ativo, sugerindo que são variantes evolutivas de uma enzima ancestral (KRAJEWSKA, 2009). O sítio ativo das ureases contém um centro binuclear de níquel (**Figura 3**; Ni(1) e Ni(2)). Os íons níquel (Ni) são ligados por uma lisina carbamilada através de seus átomos de oxigênio. Ambos os átomos de Ni também estão coordenados por duas histidinas através dos átomos de N. O Ni(2)(**Figura 3**) também apresenta-se coordenado pelo ácido aspártico através do átomo de oxigênio. Adicionalmente, os íons de Ni são ligados por um íon hidróxido (WB, **Figura 3**), que junto com duas moléculas terminais de água, W1 no Ni(1), W2 no Ni(2) e W3 (**Figura 3**), localizadas na abertura do local ativo, formam um *cluster* tetraédrico de água ligada por ligações

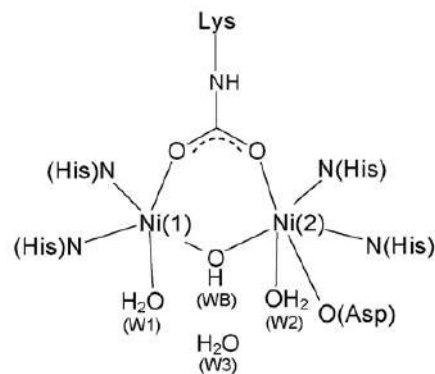
de hidrogênio, que preenchem a cavidade do sítio ativo. Este *cluster* é substituído quando a ureia se liga ao sítio ativo da reação (KRAJEWSKA, 2009).

Figura 2 - Consumo de fertilizantes nitrogenados no Brasil em 2017.



Fonte: ANDA, 2017.

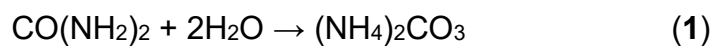
Figura 3 - Estrutura esquemática do sítio ativo da urease.



Fonte: Adaptado de Krajewska, 2009.

As ureases desempenham um papel extremamente importante no metabolismo geral do N na natureza (KRAJEWSKA, 2009). O resultado da hidrólise da ureia é a formação de NH_4^+ e CO_2 . O amônio pode ficar na forma de íon, ou ser volatilizado na forma de amônia, ou também servir de substrato para o processo de nitrificação, transformando-se em NO_3^- (ZANIN *et al.*, 2015). As plantas são capazes de absorver pequenas quantidades de ureia pelas raízes, mas especialmente absorvem o produto da hidrólise da ureia. Assim, a presença da urease nos solos permite que a ureia seja usada mais eficientemente como fonte de N pelas plantas (KRAJEWSKA, 2009).

A presença e a atividade das ureases são fatores determinantes na intensidade da hidrólise da ureia, refletindo em maiores perdas por volatilização de NH_3 . Fatores como temperatura, pH, teor de água, areação, textura do solo e quantidade de carbono orgânico também são determinantes na atividade dessas enzimas (SENGIK *et al.*, 2001). Quando a ureia é aplicada na superfície do solo é hidrolisada a carbonato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$) (equação 1), de pouca estabilidade, sofrendo rápida decomposição (equação 2) com conversão a NH_3 como segue (SENGIK *et al.*, 2001; TASCA *et al.*, 2011).



A reação de hidrólise consome H^+ e provoca o aumento do pH ao redor das partículas de ureia, conduzindo, em solos ácido, à perdas de N por volatilização da amônia (CANTARELLA, 2007).

O aumento na temperatura também contribui para o aumento da volatilização de NH_3 . Tal fato se deve à aceleração na hidrólise da ureia pelo aumento da atividade da urease (MOYO *et al.*, 1989; CLAY *et al.*, 1990; CANTARELLA, 2007; TASCA *et al.*, 2011). Em um estudo conduzido por Tasca e colaboradores (2011), as perdas totais acumuladas de N a partir da ureia sólida aplicada na superfície do solo à 35°C representaram 50% do N aplicado. A aplicação à temperatura de 18°C levou a perdas na ordem de 30%. Resultados semelhantes foram obtidos por Viero e colaboradores (2014) ao avaliarem as taxas diárias de volatilização de NH_3 no verão em comparação ao inverno em tratamentos com aplicação superficial de ureia.

A atividade da urease também é influenciada pela presença de matéria orgânica no solo (DICK, 1984). A introdução de resíduos orgânicos no solo, ou a utilização do sistema de plantio direto, resultam em maior quantidade de matéria orgânica, aumentando à atividade microbológica e, conseqüentemente, a atividade da urease, a hidrólise da ureia e a volatilização da amônia (SENGIK *et al.*, 2001; SANGOI *et al.*, 2003; CANTARELLA, 2007). As maiores perdas de NH_3 estão relacionadas à facilidade de decomposição microbológica da matéria orgânica, que por sua vez leva a maiores perdas de NH_3 (SENGIK *et al.*, 2001).

A incorporação da ureia no solo pode reduzir a volatilização de NH_3 (TRIVELIN *et al.*, 2002; SANGOI *et al.*, 2003; TASCA *et al.*, 2011). Porém, em termos práticos onera o custo de produção vegetal. Trivelin e colaboradores (2002) observaram que, em um sistema solo-cana-de-açúcar, no ciclo da cana-soca, a aplicação de ureia em profundidade acarretou 81% de recuperação do N-fertilizante, enquanto na aplicação superficial a recuperação foi de 50%.

A atividade da urease também é influenciada pela umidade do solo. À medida que o teor de umidade aumenta, a atividade enzimática também aumenta (CANTARELLA, 2007; ROCHETTE *et al.*, 2009; TASCA *et al.*, 2011). O aumento da quantidade de ureia aplicada também leva ao aumento das perdas de N- NH_3 por volatilização (TASCA *et al.*, 2011; PINTO *et al.*, 2017). Portanto, a ureia é um fertilizante nitrogenado altamente propenso a perdas de N por volatilização de NH_3 . Visto a importância de melhorar a eficiência e contornar a perda de NH_3 , algumas estratégias vêm sendo desenvolvidas e avaliadas, as quais serão abordadas nos tópicos abaixo.

2.4 Impactos econômicos e socioambientais da perda de N

2.4.1 Impactos econômicos

Para manter a produtividade agrícola e atender a necessidade alimentar da humanidade, os fertilizantes nitrogenados são extremamente relevantes, sendo responsáveis por 60 a 80% dos nutrientes disponibilizados aos grãos mais produzidos (SMIL, 2001). Considerando as várias formas de perda desse nutriente, os agricultores aplicam uma maior quantidade de fertilizantes nitrogenados, aumentando os custos da produção (SOMMER *et al.*, 2004).

Em um estudo conduzido por Pinto e colaboradores (2017), estimou-se o gasto de R\$123.200,00 para aplicar 400 kg/ha/ano de ureia em uma área de 100 ha de cafezal fertirrigado do Cerrado, considerando o preço médio do período (2009-2015). Desse montante, R\$25.150,00 correspondem às perdas por lixiviação, volatilização e desnitrificação, ou seja, cerca de 20% do recurso investido.

Para contornar essas perdas, estratégias vêm sendo adotadas, como a utilização de ureia revestida com polímeros. Em um estudo conduzido por Zavaschi (2010), a

ureia revestida mostrou menor custo na dose de 45 kg/ha e o mesmo custo na dose de 67,5 kg/ha que a ureia convencional na dose de 90 kg/ha. Assim, novas tecnologias que propiciem o aumento da eficiência de fertilizantes nitrogenados são necessárias para aumentar a produção agrícola com mínimo impacto ambiental.

2.4.2 Impactos socioambientais

O uso de fertilizantes nitrogenados e a intensificação da agricultura são temas que devem ser continuamente discutidos em relação ao impacto ambiental (BRENTROP *et al.*, 2001). A emissão global de NH_3 é estimada em 53,7 Tg de N, sendo que cerca de 65% das emissões advém de atividades agrícolas e 16% da natureza (ERISMAN *et al.*, 2007).

O excesso de N nos diversos ecossistemas provoca alterações ambientais. O N é um elemento limitante para o crescimento de plantas em diversos ecossistemas, de modo que seu excesso pode reduzir a diversidade da vegetação terrestre e a biota associada devido à promoção de espécies adaptadas a explorar rapidamente os nutrientes disponíveis. Esse declínio na riqueza de espécies é cada vez mais preocupante devido ao risco de extinções (DISE e STEVENS, 2005).

As perdas de NH_3 para a atmosfera e sua consequente deposição contribuem para a eutrofização de rios, lagos e águas marinhas, além de acidificar solos e lagos, quando NH_4^+ é convertido em NO_3^- (ISHERWOOD, 2000). Grande parte da NH_3 volatilizada é devolvida à superfície terrestre através da deposição úmida e deposição seca. Na deposição úmida a NH_3 se dissolve na água da chuva, enquanto na deposição seca ela se encontra anexada às partículas. Essa deposição causa acidificação e eutrofização dos ecossistemas naturais, podendo também representar uma forma indireta para formação de gases do efeito estufa (CAMERON *et al.*, 2013). A deposição de NH_3 e NH_4^+ também pode causar prejuízos no patrimônio cultural e contribuir para uma visibilidade reduzida de vistas panorâmicas e aeroportos (ERISMAN *et al.*, 2007).

Em relação às perdas por desnitrificação, se o gás resultante da desnitrificação for óxido nitroso (N_2O), há a contribuição com o efeito estufa (ISHERWOOD, 2000). Na atmosfera o N_2O age como um poderoso gás de efeito estufa e absorve radiação

infravermelha proveniente da superfície da terra. Essa absorção limita o escape de energia da Terra, o que resulta na elevação da temperatura média do planeta, também conhecido como aquecimento global. O N_2O tem o potencial de aquecimento global maior que do metano e do CO_2 , pois seu tempo de permanência na atmosfera e capacidade de absorver radiação infravermelha são maiores. Já o NO tem papel na química atmosférica, por ser uma molécula altamente reativa, que combina facilmente com o ozônio para formar NO_2 e regenerar NO a partir de sua reação com O_2 atmosférico. Nesse ciclo a camada de ozônio é destruída (SUBBARAO *et al.*, 2006).

Outro problema importante é a elevada concentração de NO_3^- nos corpos d'água superficiais, que leva à eutrofização, que consiste no aparecimento e crescimento de algas e aguapés, os quais reduzem os níveis de O_2 , ocasionando a morte de peixes e outros organismos aquáticos que dependem de luz e O_2 para sobreviverem. Quando se trata de águas subterrâneas, o aumento do NO_3^- só é percebido quando atinge níveis críticos, passando a prejudicar a saúde humana e sendo de difícil reversão (KAISER *et al.*, 2006).

O NO_3^- na água potável é considerado um problema de saúde pública, pois no corpo é convertido rapidamente em NO_2^- . O NO_2^- oxida a hemoglobina do sangue, que por consequência não pode transportar O_2 para os tecidos. Essa condição pode causar a síndrome do bebê-azul em bebês de até seis meses de idade. Em mamadeiras, quando a assepsia é inadequada, os microorganismos colonizadores convertem o NO_3^- a NO_2^- . Outro efeito deletério do NO_2^- para os seres humanos é a capacidade de reação com compostos presentes no estômago, produzindo nitrosaminas, de reconhecido potencial carcinogênico (ISHERWOOD, 2000).

O uso excessivo de fertilizantes nitrogenados pode aumentar a incidência de doenças e pragas nas plantas. Plantas muito vigorosas com crescimento rápido geralmente são mais sensíveis a parasitas obrigatórios e alguns parasitas são mais agressivos nas plantas vigorosas. Entretanto, as plantas menos vigorosas, com déficit de N, ainda são o alvo da maioria dos patógenos. Assim, ressalta-se a importância de uma fertilização equilibrada (ISHERWOOD, 2000).

2.5 Desenvolvimento sustentável da agricultura

De acordo com Wiebe (2009), experte da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, até 2050 a população mundial será 34% maior do que a de hoje, havendo uma grande demanda por alimentos. Portanto, a agricultura terá o desafio de prover segurança alimentar, produzindo alimentos em quantidade que atenda a demanda, sem afetar a segurança ambiental. Para atingir esse objetivo será necessário utilizar tecnologias modernas, com a finalidade de fornecer a quantidade de alimento requerido e diminuir os impactos negativos sobre o meio ambiente (CALABI-FLOODY *et al.*, 2018).

Os principais impactos ambientais da agricultura advêm da transformação de ecossistemas naturais em áreas agricultáveis; do uso de nutrientes agrícolas que poluem habitats aquáticos/terrestres e de pesticidas, principalmente poluentes orgânicos bioacumuláveis. Por meio da lixiviação, volatilização e fluxos de resíduos de gados e humanos, os nutrientes agrícolas entram em outros ecossistemas (TILMAN *et al.*, 2002). A conscientização desses problemas leva à necessidade de abordagens mais eficientes na produção de alimentos (BOYE e ARCAND, 2013).

O crescimento verde é uma estratégia que busca definir um desenvolvimento econômico que seja condizente com a proteção ambiental em longo prazo, tendo sido identificado com uma das prioridades pelos Ministros da Agricultura em reunião da OCDE em 2010. Dessa forma busca-se preservar as reservas naturais, permitindo que continuem fornecendo recursos e serviços ambientais (LEGG, 2011).

O uso das práticas e tecnologias agrícolas atuais não será sustentável em longo prazo, havendo necessidade de novas tecnologias para aumentar o rendimento da produção de alimentos e diminuir o processo de deterioração dos mesmos (BOYE e ARCAND, 2013).

2.6 Estratégias para aumentar a eficiência da ureia na agricultura

A aplicação da ureia a alguns centímetros abaixo do solo (incorporação) constitui uma forma eficiente para prevenir a volatilização de NH_3 , pois aumenta o contato do fertilizante com o solo, facilitando a adsorção do NH_4^+ pelas cargas negativas do solo (SANGOI *et al.*, 2003; TASCA *et al.*, 2011). A mistura da ureia com fertilizantes

nitrogenados, como sulfato de amônio e nitrato de amônio, também propicia diminuição da volatilização de NH_3 (VITTI *et al.*, 2002; CANTARELLA, 2007). Esses constituintes atuam como acidificantes e, quando misturados à ureia, reduzem a alcalinidade do solo durante sua hidrólise, reduzindo, assim, a perda de N por volatilização (VITTI *et al.*, 2002).

Outra estratégia é a utilização de produtos que contribuam na diminuição da taxa de liberação de nutrientes incorporados aos fertilizantes, como N, fósforo e potássio; ou na diminuição do processo de transformação desses nutrientes, reduzindo as perdas. Assim, a utilização de fertilizantes de liberação lenta/controlada e inibidores de enzimas que participam do ciclo de transformação do N, constituem duas estratégias importantes (YADAV *et al.*, 2017).

Os inibidores de urease e de nitrificação, juntamente com os fertilizantes de liberação lenta/controlada têm apresentado efeitos positivos, melhorando o aproveitamento dos fertilizantes e aumentando o rendimento agrícola (BLENNERHASSETT *et al.*, 2006; ZAMAN *et al.*, 2013 FRAZÃO *et al.*, 2014). Os fertilizantes de liberação lenta/controlada são produzidos pelos seus revestimentos ou modificação química, de forma a retardar a liberação dos nutrientes. Já os inibidores de nitrificação são compostos que retardam a oxidação bacteriana do NH_4^+ , diminuindo a atividade de microrganismos nitrificantes no solo. Por fim, os inibidores de urease são compostos que retardam a hidrólise da ureia (SUBBARAO *et al.*, 2006; AKIYAMA *et al.*, 2010).

2.6.1 Fertilizantes de liberação lenta ou controlada

Os fertilizantes de liberação lenta/controlada podem ser definidos como um produto que contém nutrientes para a planta em uma forma que limita sua disponibilidade para absorção imediata, disponibilizando-os por mais tempo do que um fertilizante de liberação convencional (AAPFCO, 1995). Esses compostos podem reduzir as perdas de N ao atrasar sua liberação, melhorando a sincronização entre a demanda e oferta de N no solo (YADAV *et al.*, 2017). Há diferenças entre fertilizantes de liberação lenta e de liberação controlada. O primeiro é formado por produtos de condensação de ureia e aldeídos de ureia, tais como ureia formaldeído, isobutilideno

diureia e crotonilideno diureia. O segundo grupo é composto por fertilizantes revestidos ou encapsulados, tais como ureia revestida com enxofre ou com polímeros (TRENKEL, 1997).

2.6.2 Inibidores de nitrificação

Os inibidores de nitrificação podem ser capazes de reduzir significativamente as emissões de N_2O e de NO ao atrasarem a atividade das bactérias *Nitrosomonas* no solo. Essas bactérias são responsáveis pela transformação de NH_4^+ em NO_2^- , que posteriormente é oxidado a NO_3^- pelas bactérias *Nitrobacter* e *Nitrosolobus* (TRENKEL, 1997; AKIYAMA *et al.*, 2010).

Dentre os inibidores de nitrificação, somente a nitrapirina e a dicianodiamida (DCD) têm ganhado importância comercial na agricultura (SUBBARAO *et al.*, 2006). A nitrapirina é comercializada pela *Dow Chemical Company*, sob a marca registrada da *N-Serve*[®], como uma alteração de fertilizante para inibição da nitrificação nos solos (BREMNER *et al.*, 1981). A DCD é a forma dimérica da cianamida e seu efeito se deve à reação do grupo $-C\equiv N$ da DCD com o grupo $-SH$ ou centro metálico das enzimas respiratórias das bactérias (AMBERGER, 1989). A DCD tem baixa volatilidade, sendo comumente misturada com fertilizantes nitrogenados sólidos. Uma das limitações mais relevantes da DCD é a fácil lixiviação para longe da rizosfera, o que diminui sua eficácia. Fatores ambientais como a temperatura, a diferença de solubilidade e a volatilidade em água influenciam na eficácia desses inibidores (AKIYAMA *et al.*, 2010).

Mais recentemente foi lançado o 3,4-dimetilpirazol fosfato (DMPP), que tem sido recomendado em grande escala pela Europa devido às vantagens em relação à DCD e à nitrapirina, tais como a facilidade de aplicação, estabilidade e eficácia por períodos mais longos e a temperaturas relativamente maiores (SUBBARAO *et al.*, 2006).

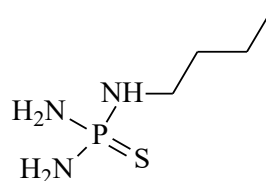
2.6.2 Inibidores de urease

Inibidores de urease são compostos que bloqueiam temporariamente a ação da enzima urease, retardando a hidrólise da ureia. Dessa forma o N é mantido na forma orgânica por um período mais longo, evitando o aumento do pH ao redor do grânulo

de fertilizante, o que diminui a disponibilidade de NH_4^+ no solo e conseqüentemente reduz o potencial de perda por volatilização (BLENNERHASSETT *et al.*, 2006). Com a utilização de inibidores de urease, a absorção de NH_4^+ pela planta acompanhará a quantidade de N disponível, minimizando o risco de excesso de NH_4^+ no solo (AKIYAMA *et al.*, 2010).

Os inibidores de urease podem ser divididos em quatro grupos principais: compostos tiólicos (ânions tiolato reagem com o centro metálico da enzima urease); ácidos hidroxicinâmicos e derivados (competem com a ureia pela ligação com o sítio ativo da urease); fosfodiamidatos, conhecidos como inibidores mais eficazes; e ligantes e quelantes do Ni (UPADHYAY, 2012). Dentre esses inibidores de urease, a substância que mais se destacou e alcançou o mercado foi o NBPT (**Figura 4**), comercializada como *Agrotain*[®] (CANTARELLA *et al.*, 2018). Ele tem sido utilizado juntamente com a ureia a fim de diminuir a velocidade de hidrólise por meio da inibição da atividade da urease (CLAY *et al.*, 1990; TASCA *et al.*, 2011). A previsão é que o mercado para o NBPT cresça a uma taxa anual de aproximadamente 2,9% nos próximos cinco anos e atingirá US \$ 61 milhões em 2023 (MARKETWATCH, 2019).

Figura 4 - Estrutura molecular do N-(butil) tiofosfórica triamida (NBPT).



Contido em uma formulação líquida que não contém água (*Agrotain*[®]), o NBPT pode ser injetado na ureia fundida antes da granulação, aplicado na superfície dos grânulos em processos contínuos de batelada ou adicionado a uma solução UAN (nitrato de amônio ureia). Para formulações líquidas como UAN, o NBPT pode ser simplesmente adicionado à solução imediatamente antes da aplicação. Porém, não é recomendável armazenar essa mistura por longos períodos devido à degradação do produto na presença de água (TRENKEL, 2010).

O NBPT atua como análogo estrutural da ureia (WATSON *et al.*, 2000). Assim, no solo se liga ao sítio ativo da urease em três pontos: nos dois átomos de Ni e em um

átomo de oxigênio no grupo ponte de carbamato. Esta interação tridentada pode explicar a capacidade do NBPT de atuar como um forte inibidor da urease (MANUNZA *et al.*, 1999). Estudos realizados por diferentes autores mostraram uma diminuição da volatilização do NH_3 (CLAY *et al.*, 1990; SOARES *et al.*, 2012; ZAMAN *et al.*, 2013), retardamento do pico de volatilização de NH_3 (TASCA *et al.*, 2011; SOARES *et al.*, 2012) e aumento da produtividade de diferentes culturas (WATSON *et al.*, 2000; BLENNERHASSETT *et al.*, 2006; ZAMAN *et al.*, 2013; FRAZÃO *et al.*, 2014;).

Em um estudo realizado por Frazão e colaboradores (2014), a ureia tratada com NBPT, a partir da dose de 65 kg N/ha, aumentou o teor de N na folha e a produtividade do milho. Em outro estudo, Clay e colaboradores (1990) constataram que o tratamento da ureia com o NBPT diminuiu a volatilização de NH_3 em 100 vezes em solos nus e cobertos por resíduos durante 4 dias de experimentação. Contudo, a estabilidade do NBPT constitui uma preocupação. Estudos têm mostrado instabilidade em temperaturas mais elevadas, como a 25° C (WATSON, 2008; CANTARELLA *et al.*, 2016), bem como menor eficácia em solos ácidos (ENGEL *et al.*, 2013; SAN FRANCISCO *et al.*, 2011). Adicionalmente, em estudo realizado por Zanin e colaboradores (2015) observou-se que o NBPT pode interferir na nutrição com ureia do milho cultivado hidroponicamente. Esse estudo mostrou que o inibidor é capaz de limitar a capacidade do milho de utilizar ureia como fonte de N. Também foi observado impacto no crescimento de plantas *Arabidopsis* na presença de ureia e do inibidor, o que pode estar relacionado ao efeito do NBPT no sistema de transporte de ureia de alta afinidade. O inibidor ainda impactou na captação da ureia em linhas de *Arabidopsis* super expressando *ZmDUR3* e *dur3-Noucaute*, sugerindo que sua assimilação é afetada pelo inibidor. O NBPT também afetou a expressão de um gene que codifica um fator de transcrição importante para regulação da aquisição da ureia.

Na formulação líquida do *Agrotain*®, o NBPT é estabilizado com solventes e aditivos. No entanto, a estabilidade da ureia revestida com NBPT ainda é questionável (CANTARELLA *et al.*, 2018). Assim, controlar a perda de NH_3 é uma tarefa difícil, visto que o produto final deve ser específico para urease, eficaz em baixas concentrações, não tóxico para as plantas e ao ambiente, estável, acessível

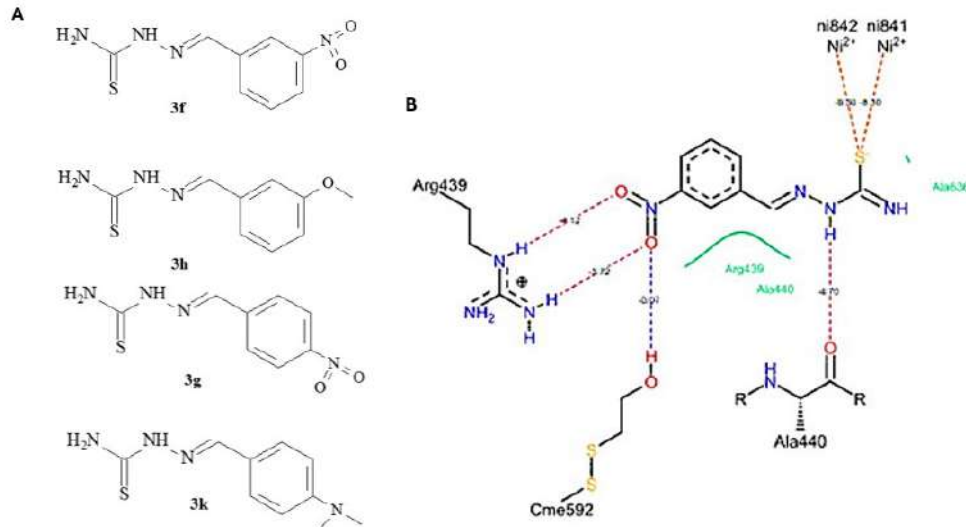
economicamente e compatível com a ureia (FENN e HOSSNER, 1985; ARTOLA *et al.*, 2011). Neste contexto, a pesquisa por novos inibidores de urease é essencial para a diminuição da poluição causada pela introdução de grandes quantidades de N no ambiente.

2.7 Bases de Schiff como inibidores de urease

Formadas a partir da reação de uma amina primária com um aldeído ou cetona em condições específicas, as bases de Schiff são análogos de N de um aldeído ou cetona, onde o grupo carbonila foi substituído por um grupo imina ou azometina ($-C=N$) (DA SILVA *et al.*, 2011; KALAIVANI e tal., 2012). Há evidências na literatura de que as bases de Schiff apresentam ampla gama de atividades biológicas, como antimicrobiana (ABOUL-FADL *et al.*, 2003; PANDEY *et al.*, 2012), anticarcinogênica (ALI *et al.*, 2012), anti-inflamatória (PANDEY *et al.*, 2012), antimalárica (RATHELOT *et al.*, 1995), antifúngica (REHMAN *et al.*, 2004) e antiureolítica (DE FÁTIMA *et al.*, 2018).

Embora as bases de Schiff possuam diferentes atividades biológicas, somente alguns exemplos desta classe foram relatados como potentes agentes antiureolíticos (DE FÁTIMA *et al.*, 2018). Aslam e colaboradores (2011) sintetizaram uma série de 18 bases de Schiff (**Figura 5a**), sendo a substância **3f** identificada como a mais potente (IC_{50} 0,102 μ M). As substâncias **3k** e **3h**, também apresentaram boa atividade (IC_{50} de 0,127 μ M e 0,177 μ M respectivamente). A substância **3f** possui um substituinte NO_2 na posição *meta* do anel aromático, sendo mais eficaz que a **3g**, que tem esse grupo na posição *para* (**Figura 5a**). Quando o $-NO_2$ foi substituído por um grupo de ativação, grupo $N-(CH_3)_2$ na substância **3k**, a atividade antiureolítica também foi reduzida. Esse estudo também mostrou o acoplamento molecular do composto **3f** com a enzima urease *Jack bean* (**Figura 5b**), onde o átomo de enxofre foi coordenado com os átomos de Ni e ligações de hidrogênio nos resíduos Arg439 e Cme592 foram formadas com os átomos de O do grupo nitro. Também foi observada uma ligação de hidrogênio entre o resíduo Ala440 e o inibidor **3f**. A substância **3f** apresentou um mecanismo de inibição competitivo na avaliação da cinética enzimática.

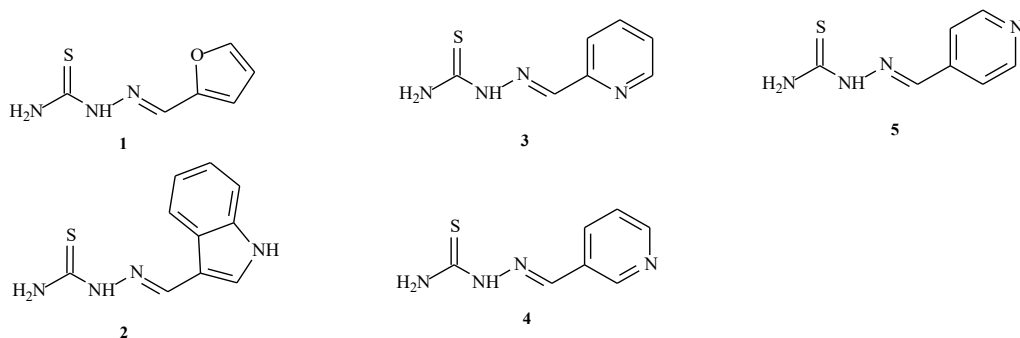
Figura 5 - (A) Bases de Schiff sintetizadas para verificação da atividade antiureolítica; (B) conformação ancorada da substância 3f com a urease *Jack bean*. Cme592 representa o resíduo Cys-592.



Fonte: adaptado de Aslam *et al.*, 2011.

Em outro estudo, Saeed e colaboradores (2015) sintetizaram bases de Schiff derivadas de tiossemicarbazida. Das 13 substâncias sintetizadas, 7 apresentaram atividade antiureolítica promissora. A substância **1** (Figura 6) foi o inibidor mais potente contra a urease *Jack bean* (IC₅₀ 0,58 μM), mostrando que um heterocíclico menor (substância **1**) propiciou maior eficiência que um indol (substância **2**). A posição do heteroátomo em relação ao grupo azometina também foi identificado como importante para inibição da urease nas bases de Schiff contendo piridina, sendo as substâncias **3** e **4** mais potentes que **5** (Figura 6).

Figura 6 - Bases de Schiff derivadas de tiossemicarbazida com atividade antiureolítica.



Fonte: adaptado de Saeed *et al.*, 2015.

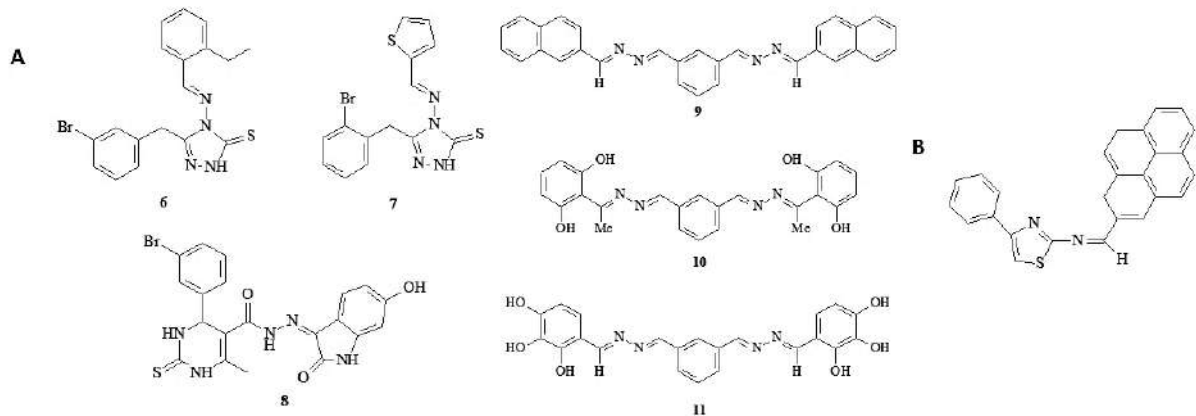
Em uma revisão conduzida por De Fátima *et al.* (2018), diferentes bases de Schiff com atividade antiureolítica, oriundas de diferentes estudos, foram apresentadas (**Figura 7A**). Nessa revisão foi chamada atenção para as bases de Schiff contendo núcleos de 1,2,4-triazol, sintetizadas por Rafiq e colaboradores (2017). Dentre as substâncias sintetizadas, a **6** (IC₅₀ de 8,02 ± 0,59) e **7** (IC₅₀ de 17,02 ± 4,63 μM) apresentaram maior potencial de inibição que a tioureia (IC₅₀ = 20,9 ± 0,92 μM), um inibidor de referência. As base Schiff da isatina **8** (IC₅₀ 0,23 μM), sintetizadas por Iftikhar e colaboradores (2017); e as *bis* bases de Schiff derivadas de isoftalaldeído sintetizadas por Rahim e colaboradores (2016), respectivamente substâncias **9** (IC₅₀ de 13,8 μM), **10** (IC₅₀ de 13,9 μM) e **11** (IC₅₀ de 18,3 μM), também apresentaram-se como promissoras. Em relação às patentes, somente há duas menções sobre bases de Schiff atuando como inibidores de urease (DE FÁTIMA *et al.*, 2018). Uma está relacionada às bases de Schiff de tiazóis, onde 28 substâncias foram sintetizadas e 10 foram avaliadas cineticamente em relação à enzima urease. De todas as substâncias avaliadas, o inibidor mais potente foi um tiazol (**Figura 7B**), que apresentou um valor de IC₅₀ de 2,80 μM (CHOUDHARY *et al.*, 2015).

A outra patente existente foi publicada por Modolo e colaboradores (2016), onde bases de Schiff foram sintetizadas e incorporadas em grânulos de ureia. Essas bases mostraram atividade igual ou superior a do NBPT em plantas da família *Poaceae*, como o milho. Adicionalmente, essas bases apresentaram rotas de síntese mais simples, baratas, além de maior estabilidade térmica. Dentre as 71 substâncias sintetizadas na patente citada, duas foram escolhidas para fazerem parte desse trabalho e seguir com estudos de prospecção e viabilidade para o desenvolvimento de um produto para otimização de fertilizantes nitrogenados: a 3B4 (**Figura 8A**) e 3D6 (**Figura 8B**). Adicionalmente, também incluímos uma amina derivada da imina 3B4, a substância 3B4a (**Figura 8C**), que foi avaliada quanto à atividade frente a enzima urease, sendo comparada ao seu análogo.

As substâncias 3B4 (IC₅₀ de 27 μM) e 3D6 (IC₅₀ de 234 μM) apresentaram resultados promissores nos estudos *in vitro* de inibição da urease *Cavanalia ensiformis* e na avaliação da inibição da urease em solo (MODOLO *et al.*, 2016; CHAVES-SILVA *et al.*, 2020). Recentemente foi observado que ambos inibidores não impactaram negativamente a germinação de sementes de alface e milho.

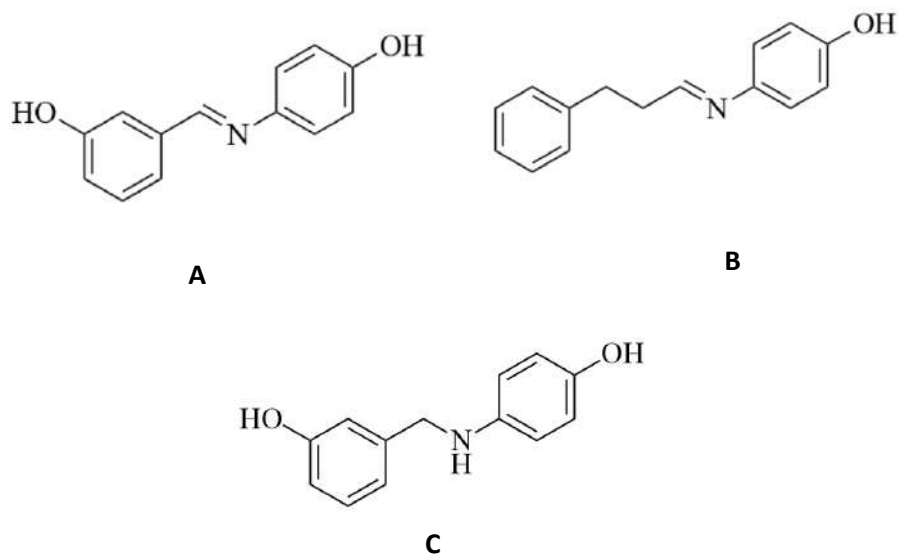
(CHAVES-SILVA *et al.*, 2020). Assim, essas substâncias constituem candidatos promissores para a obtenção de um produto para otimização da utilização de fertilizantes nitrogenados (CHAVES-SILVA *et al.*, 2020).

Figura 7 - (A) Bases de Schiff com atividade antiureolítica; (B) Estrutura química da base de Schiff de tiazol patenteada por Choudhary e colaboradores (2015).



Fonte: Adaptado de DE FÁTIMA *et al.*, 2018.

Figura 8 - Estrutura química das substâncias 3B4(A), 3D6(B), 3B4a(C).



3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver uma formulação segura para veiculação dos inibidores prospectados (3D6, 3B4, 3B4a) e avaliar o perfil dessas substâncias e em estudos complementares.

3.2 Objetivos específicos

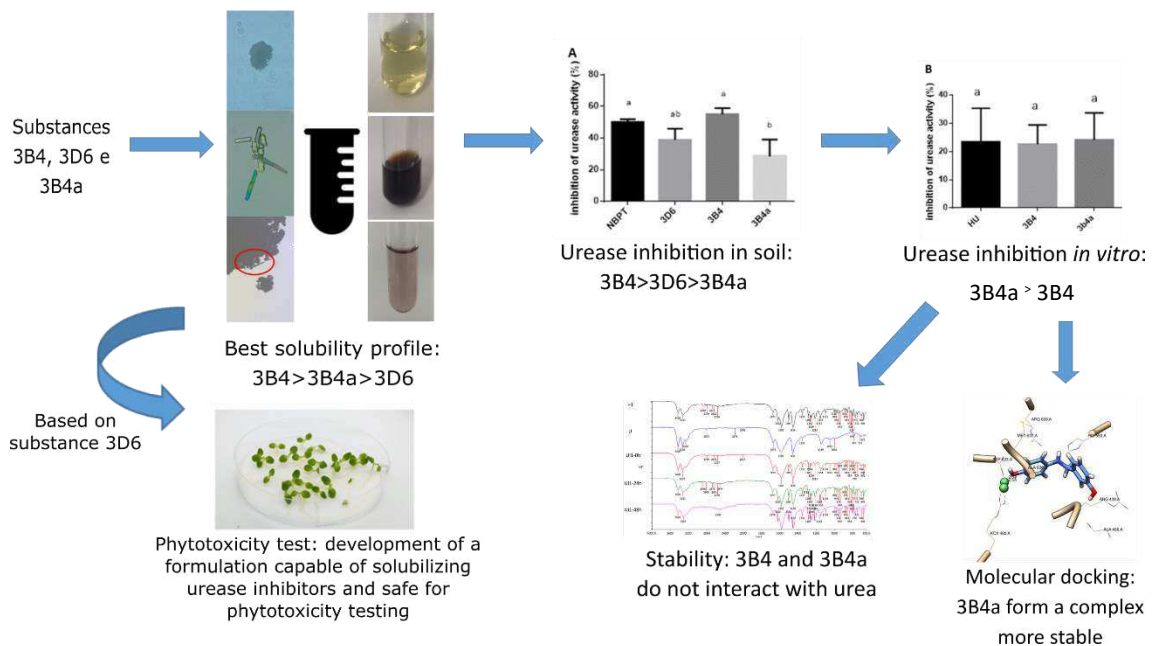
- Realizar estudos de pré-formulação avaliando a solubilidade e reatividade das bases de Schiff 3B4 e 3D6, e da amina 3B4a;
- Desenvolver uma formulação segura para veiculação dos inibidores de urease visando a avaliação da fitotoxicidade em estudos de germinação com sementes de alface (*L. sativa* L.);
- Comparar a atividade antiureolítica em solo das bases de Schiff (3B4 e 3D6) com a amina sintetizada (3B4a);
- Comparar a atividade antiureolítica *in vitro* da base de Schiff 3B4 e sua amina (3B4a);
- Avaliar a relação estrutura-atividade através de estudos de *docking* molecular dos inibidores análogos (3B4 e 3B4a);
- Avaliar a interação das substâncias mais promissoras (3B4 e 3B4a) com a ureia, nos tempos 0, 24 e 48h, utilizando a técnica de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).

4 DESENVOLVIMENTO

Este trabalho foi escrito em formato de artigo científico a ser submetido no Journal *Industrial Crops and Product*.

Prospection of Promising Urease Inhibitors for the Optimization of a Nitrogen Fertilizer

Prospection of Promising Urease Inhibitors



ABSTRACT: Urea is the most used nitrogen fertilizer worldwide. However, losses due to ammonia volatilization when urea is applied to soil surface cause great economic and environmental problems. Urease inhibitors have been developed and used to mitigate N losses. In this work two Schiff bases (3B4 and 3D6) and a 3B4-derived amine (3B4a) were investigated aiming provide information to development of a product for agricultural use. All the three substances were poorly soluble in water, which required the development of a hydrophilic formulation to convey them. The developed formulation (0.05% ethanol, 0.05% dimethyl sulfoxide, 0.5%

propylene glycol, 1.4% polyethylene glycol-400 and 98% distilled water) proved to be no phytotoxic to lettuce seed (*Lactuca sativa* L.) and able to convey these substances. Substance 3B4 ($55 \pm 4\%$ inhibition) was the most promising urease inhibitor on soil showing results comparable to those of NBPT. 3D6 and 3B4a inhibited soil ureases by $39 \pm 7\%$ inhibition and $29 \pm 11\%$ inhibition, respectively. In contrast, 3B4 and 3B4a were equally statistically towards the urease of *Canavalia ensiformis* ($23 \pm 7\%$ and $24 \pm 10\%$, respectively). Molecular docking study showed that the interaction between 3B4a and the enzyme urease resulted in a more stable complex. No interactions between 3B4 or 3B4a with urea were observed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) when compounds were mixed (1:1) for up to 48 h. Overall, the Schiff base 3B4 and corresponding amine 3B4a are promising additive candidates for further studies as urease inhibitors.

KEYWORDS: Urease inhibitors, urea, Schiff bases, NBPT, phytotoxicity.

1 INTRODUCTION

Nitrogen (N) is an essential element for the production of macromolecules and small key molecules such as chlorophyll. The use of N fertilizers is therefore pivotal for maintaining crop productivity and guarantee food security for the growing global population (Galloway and Cowling, 2002; Rothstein, 2007). It is predicted that the global N supply will increase by an average of 1.3% per year until 2023 opposed to a yearly increase of the demand by 1.4% in the same period (IFA, 2019). Depending on the fertilizer, considerable N losses due to soil erosion, leaching, biological immobilization, ammonia volatilization and denitrification are critical issues to overcome. Such events can cause environmental problems such as eutrophication of ecosystems, acidification of soils and lakes, increment in the production of

greenhouse gases and destruction of the ozone layer (Gruber and Galloway, 2008; Isherwood, 2000; Matson et al., 1997; Yamada and Abdalla, 2000). In this context, the efficient use of N fertilizers is the basis for maintaining food security in a more sustainable agriculture (Rütting et al., 2018).

Due to the high relative content of N and low price, urea is the most used N fertilizer in the world, with an estimated demand of 184 million tons in 2023 (Cantarella et al., 2018; Frazão et al., 2014; Garside, 2019; Trenkel, 2010). However, urea can suffer large losses of N due to its hydrolysis to the gases ammonia and carbon dioxide catalyzed by soil ureases (Krajewska, 2009; Zanin et al., 2015). In fact, urea hydrolysis can cause an increase in soil pH, in which ammonia (NH_3) is favored over ammonium (NH_4^+) (Cantarella, 2007).

To minimize the economic and environmental losses arising from urease activity on urea, some strategies have been adopted, such as the use of urease inhibitors (Blennerhassett et al., 2006). The *N*-(butyl) thiophosphoric triamide (NBPT) is the most commercially used urease inhibitor in agriculture (Cantarella et al., 2018; Trenkel, 2010). NBPT has been used in conjunction with urea to slow down hydrolysis and decreasing ammonia volatilization (Clay et al., 1990; Tasca et al., 2011; Trenkel, 2010). However, studies have shown thermal instability of NBPT at temperatures above 25° C (Cantarella, et al., 2016; Watson et al., 2008) lower effectiveness in acid soils (Engel et al., 2013; San Francisco et al, 2011) and, as it is an imported product, it generates high costs for Brazilian agricultural production (Modolo et al., 2016). Moreover, NBPT formulation is very viscous, moisture-sensitive, and waxy (Modolo et al., 2016). Therefore, the search for new urease inhibitors with improved traits (such as high stability, low toxicity to plants and the environment) is crucial for optimizing the efficiency of urea fertilizers (Artola et al.,

2011). Among the new substances synthesized by our research group, the Schiff bases have excelled due to an easier synthesis process at low costs in comparison to NBPT (Modolo et al., 2016). Two out of 71 synthesized substances (3B4 and 3D6) were then chosen for the prospection and feasibility studies (**Fig. 1 A-B**) since they showed promising results in the inhibition of urease *in vitro* and soil as well (Chaves-Silva et al., 2020; Modolo et al., 2016). Additionally, 3B4 and 3D6 are thermally stable with a mass loss of less than 2% to a temperature of 200 °C, while NBPT up to a temperature of 170 °C losses approximately 15% of its mass (Modolo et al., 2016). In this work, the solubility of 3B4, 3D6 and 3B4a (a 3B4 amine derivative; **Fig. 1C**) was investigated in several solvents and cosolvents to develop formulations that allow the evaluation of the safety use of these substances on lettuce seeds. The antiureolytic activities of 3B4 and 3B4a were compared in soil and *in vitro* followed by molecular docking study to better understand the structural features responsible for the antiureolytic activity. In addition, the interaction of substances 3B4 and 3B4a with urea was evaluated to obtain more information on the feasibility of obtaining a product from these assets.

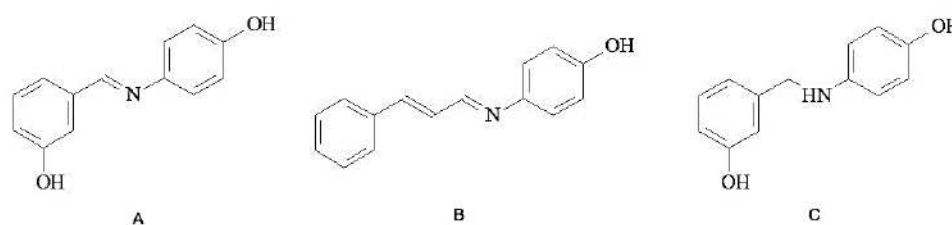


Fig. 1. Chemical structure of the substances 3B4 (A), 3D6 (B) and 3B4a (C).

2 EXPERIMENTAL SECTION

2.1 Solubility and Polarized light microscopy

2.1.1. Solubility

The solubility assessment of the 3B4, 3D6 and 3B4a actives was performed according to the American Pharmacopoeia (2015). The descriptive terms contained in **Table S1** (Supporting information) were used to express the solubility of the substances. After the addition of each solvent, each solution was sonicated (Ultronic Eco-sonics, ultrasonic washer Q3.8/40A, Brazil) for 1 min. The solvents evaluated were 0.1 M hydrochloric acid (HCl), 0.1 M sodium hydroxide (NaOH), anhydrous ethanol (EtOH), dimethylsulfoxide (DMSO), acetonitrile (ACN), methanol (MeOH), 0.3 % (v/v) hydrogen peroxide (H₂O₂), 1 mM copper sulfate (CuSO₄), and distilled water. These solvents were chosen because they are suitable for use in the development of analytical methods and can help to determine reactivity of the analytes, here named 3B4, 3D6 and 3B4a. The substances were considered soluble when no solid particles were seen in the solution by naked eye.

2.1.2. Polarized light microscopy

A suspension of 3D6, 3B4 and 3B4a (1 mg per two drops of distilled water) was individually added to a glass slide and covered with a cover slip to evaluate the samples by Polarized Light Microscopy (Carl Zeiss Microscopy SL, Zeiss Axio Imager M2, Germany). Images were analyzed using the ZEN Lite 2012 software (Carl Zeiss Microscopy S.L., Germany).

2.2 Evaluation of urease inhibition in soil

The antiureolytic activity of 3B4, 3D6 and 3B4a was evaluated in a dystrophic clayey Red Latosol collected from an agricultural land located in the Brazilian Cerrado (19°28'01.2"S, 44°10'24.5"W) as described by Kandeler and Gerber (1988), with

modifications (Brito et al., 2015). The physicochemical characteristics of the soil used were 16.40% sand, 23.64% silt and 59.96% clay; pH 5.8; 10.4 mg dm^{-3} P_{Mehlich} ; 240 mg dm^{-3} of K; $4.44 \text{ cmol}_c\text{dm}^{-3}$ of Ca^{2+} ; $1.17 \text{ cmol}_c\text{dm}^{-3}$ of Mg^{2+} ; $0.06 \text{ cmol}_c\text{dm}^{-3}$ of Al^{3+} ; $2.99 \text{ cmol}_c\text{dm}^{-3}$ H + Al, base sum of $6.22 \text{ cmol}_c\text{dm}^{-3}$ and organic matter equivalent to 3.60 dag kg^{-1} . The soil was sieved using 2 mm mesh sieves and samples of 0.5 g, previously activated with water for 24 h, were placed in 15 mL tubes. For the evaluation of urease inhibition in soil, each tube contained 500 μM of the test substances solubilized in ethanol, and 72 mM of urea (Merk, Darmstadt, Germany). Samples were incubated in the Shaker (Thermo Scientific, MaxQ4000, USA) at 37°C for 1 h. Reactions were stopped by adding 5 mL of 1 M KCl in 1 M HCl. Each system was incubated for a further 30 min and then centrifuged (Thermo Scientific, Heraeus Fresco 17 Centrifuge, USA) for 3 min at $10,000 \times g$. After centrifugation, 100 μL of a solution containing 3.4% (w/v) sodium salicylate, 2.5% (w/v) sodium citrate, 2.5% (w/v) sodium tartrate and 0.012% (w/v) sodium nitroprussiate was added to the 20 μL of the supernatant, which was incubated for 15 min at 25°C and 600 rpm. An additional 100 μL of a solution containing 3.0% (w/v) NaOH in 1% (v/v) sodium hypochlorite was added, followed by incubation for 1 h at 25°C in the dark under 600 rpm. The ammonium formed was quantified at λ 660 nm with the aid of a calibration curve using ammonium chloride as a standard. All experiments were performed in triplicate with 5 technical replicates for each substance. NBPT was used as a reference of urease inhibitor. NBPT was used only in the soil experiment, as it is in the soil that degradation products are formed, such as the oxon analogue, which substantially influence its antiureolytic activity (Creason et al., 1990; Peters and Thiele-Bruhn, 2022).

2.3 Evaluation of urease inhibition *in vitro*

Since the antiureolytic activities in soil was higher for 3B4 in comparison to 3D6, the evaluation of urease inhibition *in vitro* was only conducted with 3B4 and its amine (3B4a). This test was useful to better understand and rationalize the interactions between the enzyme urease and the urease inhibitors proposed by molecular docking.

Reactions were performed in 20 mM phosphate buffer (pH 7.0) containing 1 mM EDTA, 12.5 mU urease of *Cavanalia ensiformis* enzyme (Sigma Aldrich, USA), 10 mM urea in the presence or absence of each compound at 50 μ M (solubilized in ethanol) (Brito et al., 2015). The reactions were incubated at 25 °C for 10 min and stopped by adding 0.5 volume of 1% w/v phenol in 5 mg L⁻¹ sodium nitroprusside (SNP) and 0.7 volume of 0.5% w/v NaOH in 0.1% v/v sodium hypochlorite. The systems were incubated at 50 °C for more 5 min followed by quantification of NH₄⁺ at λ 630 nm. Hydroxyurea (HU) (Sigma Aldrich, USA) was used as the inhibitor reference. The experiments were performed in quadruplicate with 4 repetitions for each substance.

2.4 Molecular Docking

For the molecular modeling studies, compounds 3B4 and 3B4a were constructed using the Marvin software (Sanner, 1999) and the jack bean urease (*C. ensiformis*) 3D structure was obtained from the Protein Data Bank website (PDB entry: 4H9M). To obtain the urease in its native state, molecular dynamics (MD) simulations were performed prior to docking studies. Thus, the OPLS solvation model (Jiang et al., 2017) was added to the urease structure. The simulations were performed using the GROMACSs package (Pronk et al., 2013). Water molecules and a hydrogen ion concentration (pH 7.0) were added at the atomic level, considering a triclinic box.

The geometry of the urease was optimized with the steepest descent algorithm followed by conjugate gradient minimization. Two previous stabilization steps were performed at 1000 ps with a time step of 2 fs using NVT and, then, sets of 300 K NPT isobaric and isothermal to relax the water molecules, and to stabilize the box density. MD simulations were carried out at 300 K for 30 ns (1 fs time step). The Lennard-Jones and the real space part of the electrostatic interactions were cut-off at 1.0 nm. For long-range electrostatic interactions, the particle-mesh Ewald (PME) method was used with the reciprocal-space interactions evaluated on a 0.12 nm grid with cubic interpolation of order four. The P-LINCS algorithm was used to constrain all bond lengths. Isotropic pressure coupling was applied using the Berendsen algorithm at 1 bar with a time constant of 3.0 ps and a compressibility of $4.5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$. The Parrinello–Rahman velocity rescale thermostat algorithm was applied independently for protein and water molecules at 300 K. Periodic boundary conditions were applied in all directions. Molecular graphics and analyses were performed with the UCSF Chimera package (Silva et al., 2017). The MD analysis module of UCSF Chimera was used to obtain the most predominant conformation of the enzyme in the system.

After MD simulations, the most stable conformation of the jack bean urease was selected for molecular docking studies. The optimization of the compounds studied was performed with the classic method, using the AMBER 99bsc0 force field and assigning partial charges AM1-BCC, automatically performed by the UCSF Chimeras dock prep module. The UCSF Chimeras package was used to perform all molecular docking simulations. Water molecules and counter ions previously added in MD simulations were removed from the resulting structure. All simulations were carried out considering the area of the active site from the jack bean urease.

2.5 Evaluation of the interaction between 3B4 and 3B4a with urea

The Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) technique was used to verify the interaction between 3B4 and 3b4a with urea. FTIR spectra were recorded using the Spectrum One Perkin-Elmer equipment with ATR system and absorption was measured in wave number (cm^{-1}). The analysis was performed with the 1:1 mixture of urea and 3B4 or 3B4a ground with a pestle in an agate mortar. The samples (protected from light) were prepared and analyzed after 0, 24 and 48 h post preparation.

2.6 Development of a safe formulation to carry the urease inhibitors

Since the solubility study showed 3D6 urease inhibitor as the less hydrophilic substance, it was selected as the worst case for the formulation development. Several combinations of solvents and cosolvents were selected to evaluate the most adequate proportion to be used. Approximately 1 mg of 3D6 was added to 1 mL of the proposed formulation followed by sonication for 1 min at room temperature. The solubility was classified at three levels, in which (1) was considered fully soluble (no visible particles in suspension), (2) was of intermediate solubility (presence of few solid particles in suspension) and (3) stood for poorly soluble or insoluble (presence of solid particles nearly in the same amount as initially). The procedure carried out in four steps is detailed in **Table 1**. After each screening step, the most promising formulations were evaluated for the effect on the germination of lettuce seeds. According to the obtained results, the next step screening was proposed.

Table 1. Different combinations of ethanol (EtOH), polyethylene glycol 400 (PEG-400), propylene glycol (PROP), DMSO, Tween 20®, Tween 60® and Triton X-100® evaluated for solubilization of 3D6 urease inhibitor and germination test in lettuce seeds.

Solutions	EtOH (%)	PEG-400 (%)	PROP (%)	Tween 20® (%)	Tween 60® (%)	Triton X-100® (%)	DMSO (%)	Distilled water (%)
First screening								
1	90	5	5	-	-	-	-	-
2	5	90	5	-	-	-	-	-
3	5	5	90	-	-	-	-	-
4	50	25	25	-	-	-	-	-
5	25	50	25	-	-	-	-	-
6	25	25	50	-	-	-	-	-
7	50	50	0	-	-	-	-	-
8	0	50	50	-	-	-	-	-
9	50	0	50	-	-	-	-	-
Second screening								
4DIL*	1	0.5	0.5	-	-	-	-	98
5DIL#	0.5	1	0.5	-	-	-	-	98
Third screening								
10	0.25	1	0.5	-	-	-	0.25	98
5DIL#	0.5	1	0.5	-	-	-	-	98
11	0.5	-	0.5	1	-	-	-	98
12	0.5	-	0.5	-	1	-	-	98
13	0.5	-	0.5	-	-	1	-	98
Fourth screening								
14	0.05	1.4	0.5	-	-	-	0.05	98
15	0.05	1.3	0.5	-	-	-	0.15	98
16	0.1	1.3	0.5	-	-	-	0.1	98

*4DIL: represents dilution of solution 4; # 5DIL: represents dilution of solution 5.

2.7 Seed germination

The germination test (Brasil, 2009) was used to verify potential phytotoxic effect of the developed formulations (**Table 1**). Among the species used in this evaluation, Lettuce seeds (*Lactuca sativa* cv. Regina Summer) were used because it is considered an important model (Pino et al., 2017; Falanga et al., 2020). In the evaluations, 1 mL of each formulation was diluted 50 times in distilled water, following the amount of solution used in the previously established germination test protocol (Brazil, 2009). Then, three aliquots of this solution (5 mL) were transferred to

3 Petri dishes (Greiner Bio-one, 90X15 mm), previously sanitized with soap, water and 70% alcohol. Each plate received 25 seeds, which were deposited on two circular 9 cm diameter filter paper, moistened with an aqueous solution of 0.5% Nystatin. The plates were incubated in a biochemical oxygen demand chamber (Fanem, BOD 347CDG, Brazil) at a temperature of 25° C and 12 h photoperiod. After seven days of germination, the following variables were evaluated: number of germinated seeds, root length, germination speed index (Edmond and Drapala, 1958), average germination time, germination percentage, average germination time of 50% of the seeds (T50) (Soltani et al., 2015) and average germination speed. Dry weight and fresh weight factors were only evaluated for the most promising solutions (solutions 14, 15, and 16). Non germinated seeds were evaluated by the tetrazolium test at the end of the experiment to determine their viability (Souza et al., 2010). Distilled water was used as a comparison standard (control group), being added to replicates with the same specifications and submitted to the germination process over seven days under the same conditions as the test samples.

2.8 Statistical analysis

The results were presented as means \pm standard deviations. Normality was assessed by the *Kolmogorov–Smirnov* test and homocedasticity by the *Brown-Forsythe* test. If the data were normal and homocedastic, parametric statistics was used: t-test for two groups and one-way ANOVA test with Tukey *post-test* for more than two groups. Outlier analysis was performed a 10% Q ROUT test. Were considered significant p values <0.05 . Analyzes were performed using GraphPad Prism® 6 software.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Solubility and Polarized light microscopy

The solubility of substances 3B4, 3D6 and 3B4a (**Fig. 1**) in the selected solvents is presented in **Table 2**.

Tables 2. Solubility classification of substances 3B4, 3D6 and 3B4a.

SOLVENTS	3B4	3D6	3B4a
Distilled water	Insoluble	Insoluble	Insoluble
ACN	Sparingly soluble	Very slightly soluble	Slightly soluble
MeOH	Soluble	Slightly soluble	Freely soluble
EtOH	Soluble	Very slightly soluble	Slightly soluble
DMSO	Soluble	Soluble	Soluble
0.1 M HCl	Sparingly soluble	Insoluble	Slightly soluble
0.1 M NaOH	Slightly soluble	Insoluble	Slightly soluble
1mM CuSO₄	Insoluble	Insoluble	Insoluble
0.3% H₂O₂	Insoluble	Insoluble	Insoluble

The assessment of the urease inhibitors solubility, an essential requirement in preformulation studies, showed that the synthesized urease inhibitors are insoluble in water. Insolubility in water is the main problem encountered in the development of formulations containing new molecules (Savjani et al., 2012). According to Savjani et al. (2012), over 40% of the new molecules synthesized in the chemical-pharmaceutical industry are practically insoluble in water. The evaluated substances presented solubility in DMSO, ACN, MeOH, and EtOH. However, some of these solvents cannot be used in the formulations or can only be used at defined concentration due to the risk of toxicity to the environment and living beings. One strategy to increase the solubility of substances is the use of cosolvents (Vemula et al., 2010). Thus, different formulations were tested using EtOH, DMSO, polyethylene glycol 400 (PEG-400), and propylene glycol (PROP) as (co)solvents and surfactants to improve the solubility of the synthesized compounds.

Acidic and basic conditions improved the solubility of 3B4 and 3B4a, however, these conditions do not make the compounds completely soluble (**Table 2**). According to

Shoghi et al. (2013), solubility may depend on the acidity constant (pK_a) and the pH of the medium, a feature applicable to ionizable substances. Thus, it is likely that 3B4 and 3B4a are ionized according to the pH of the medium. The expected ionized functional groups for 3B4 and 3B4a at extreme pH values provided by HCl and NaOH are shown in **Fig. 2**.

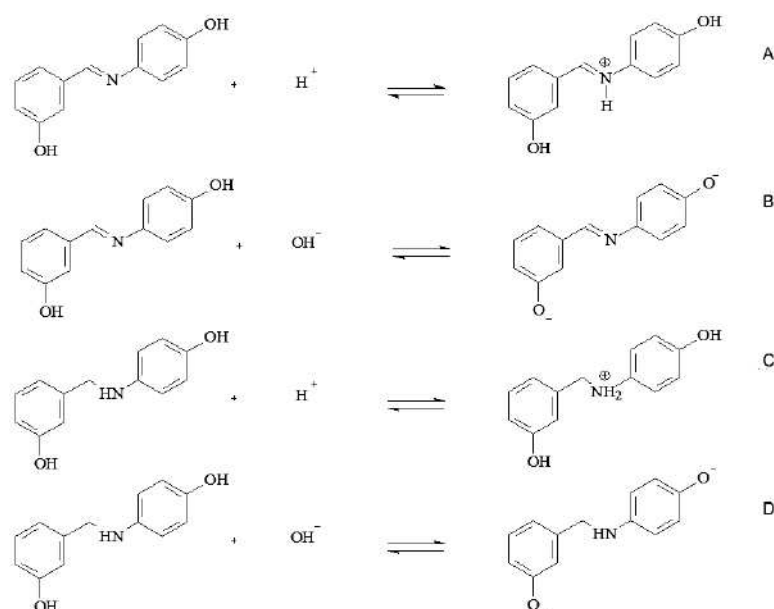


Fig. 2. Ionization of imine 3B4 in (A) acidic and (B) basic media and amine 3B4a in (C) acid and (D) basic media.

When the NaOH solution was used as solvent, the solution containing 3B4 changed the color from light yellow to brown (**Fig. 3A**). This fact is probably due to the hydrolysis of 3B4 in basic medium. The brown color is owe to aromatic amine, 4-hydroxyaniline, which turns dark when exposed to air and light (U.S. National Library of Medicine, 2019). The reaction might explain this result is showed in **Fig. 3C**. If the protonated imines are in a basic medium (despite the low probability), their reactivity increases, since the hydroxide ions will act as nucleophiles. The protonation of N in intermediate, highlighted in red circles, makes the amine a good leaving group

(Carey and Sundberg, 2007). Although this change was observed in basic medium, no change was observed in acid medium. Possibly these reactions are a function of solution pH, imine basicity and aldehyde reactivity (Carey and Sundberg, 2007).

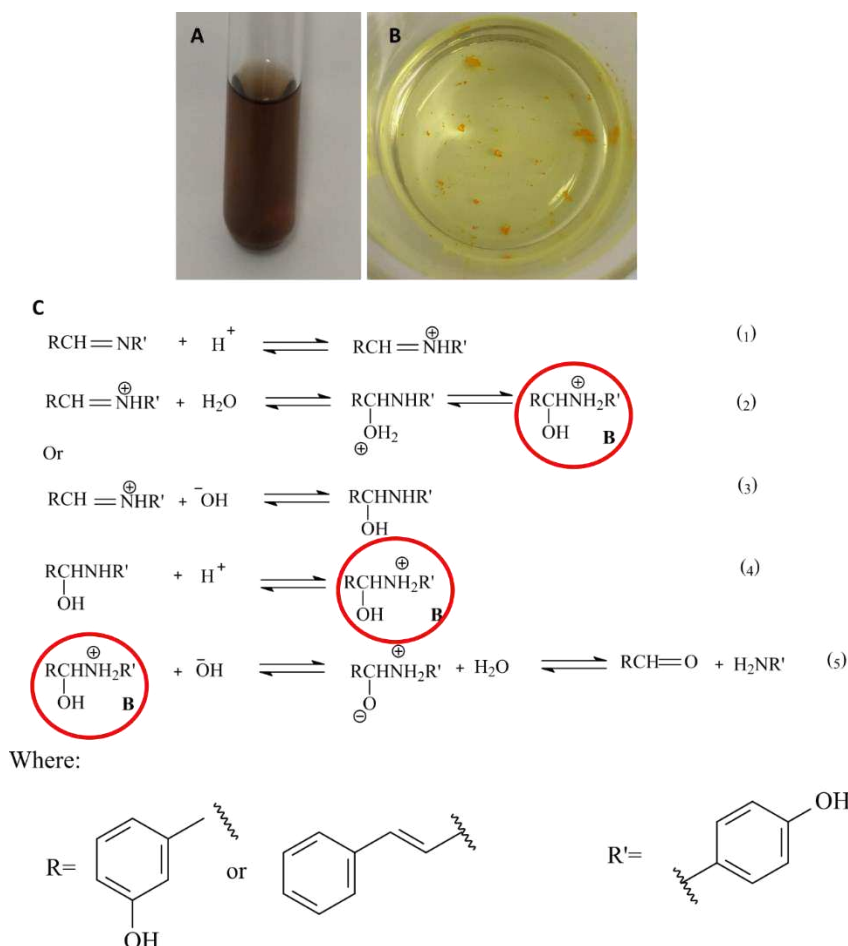


Fig. 3. Effect of pH on the synthesized compounds. (A) Substance 3B4 in the presence of 0.1 M NaOH ; (B) substance 3D6 in the presence of 0.1 M HCl; (C) acid and basic imine hydrolysis reactions proposed by Carey and Sundberg (2007). The protonation of N in intermediate is highlighted in red circles.

The substance 3D6 was less soluble in hydrophilic solvents than was 3B4 and 3B4a, which is probably due to the *trans*-cinnamaldehyde core that is more apolar than the 3-hydroxybenzaldehyde present in 3B4 and 3B4a structures (**Fig. 1**). Therefore, the solubility of studied substances was influenced by their polarity. When 3D6 was dissolved in HCl solution, oranges particles (**Fig. 3B**) and a characteristic *trans*-

cinnamaldehyde odor were observed, indicating a hydrolysis process (**Fig. 3C**, steps 1, 2 and 5). However, no change was observed under basic condition, probably due to the factors mentioned above.

Soils may have different pH, which can significantly influence the solubility and nutrient availability for plants; pesticide and herbicides performance, and organic matter decomposition (Mccauley et al., 2017). N is one of the main nutrient used in agriculture that affects soils pH and can make them more acidic or more alkaline depending on the type of N fertilizer applied (McLaughlin, 2009). Engel et al. (2015) showed that abiotic chemical hydrolysis strongly contributes to NBPT degradation in soils under acidic to slightly alkaline conditions. Similarly, the acidic and basic soils may also interfere with the performance of the imines. The amine 3B4a obtained from the reduction of the imine group at 3B4 prevents the nucleophilic attack on sp^2 carbon.

Similarly to the observed for 3B4, the color of 3B4a solution changed in alkali media, but this process occurred more slowly (**Fig. 4A-B**). A darkening process was also observed in the solutions containing H_2O_2 , distilled water (after 1 day) and $CuSO_4$ (**Fig. 4C-E**). In the case, no hydrolysis occurs, since 3B4a does not bear carbon with a positive partial charge to act as an electrophile as it occurs in the corresponding imine. 3B4a is an aromatic amine and as such it can be easily oxidized by a variety of reagents, including molecular oxygen. This oxidation is not restricted to the amino group and can occur also in the ring as the amino group is an electron donor, which makes the ring rich in electrons and susceptible to oxidation (Solomons and Fryhle et al., 2001). The abstraction of hydrogen atoms by oxidant agents leads to more complex changes and highly colored products (Caserio et al., 1977). Thus, it can be

inferred that the amine 3B4a may undergo oxidation in media containing CuSO_4 or H_2O_2 in the presence of molecular oxygen and/or light.

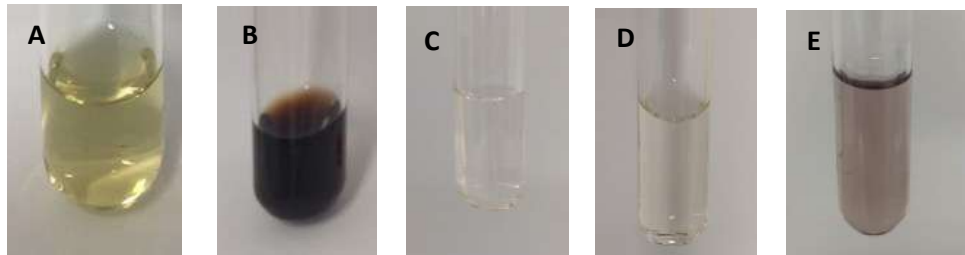


Fig. 4. Substance 3B4a in 0.1 M NaOH solution at time 0 (A) and after 1 day (B); in 0.3% (v/v) H_2O_2 (C), after 1 day in distilled water (D) and in 1mM CuSO_4 (E).

The internal structure of substances (polymorphic, amorphous, crystalline) can also interfere in the solubility (Allen et al., 2013). **Fig. 5** illustrates the images of the substances 3B4, 3B4a and 3D6 obtained by Polarized Light Microscopy. 3B4 appears as an amorphous substance (**Fig. 5A**).

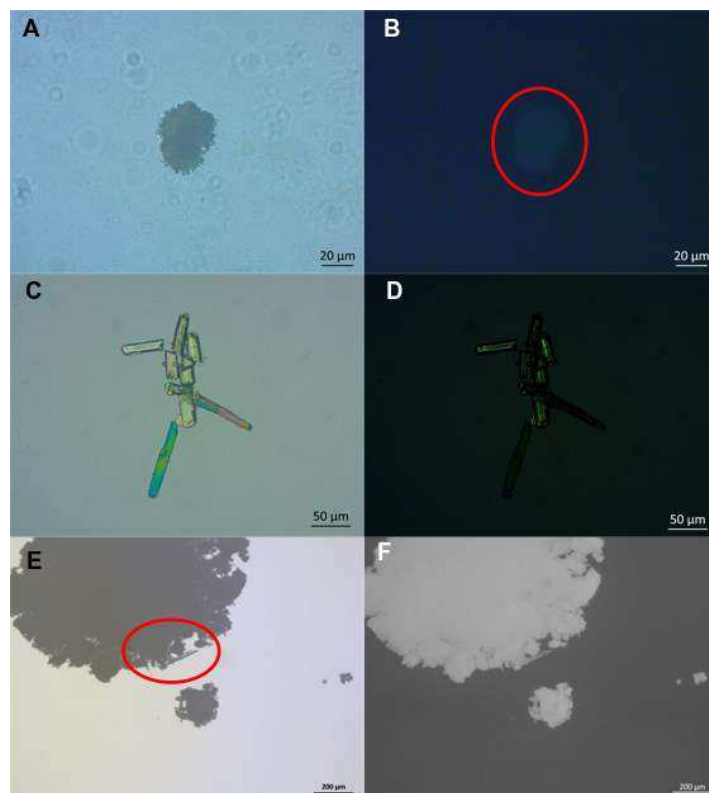


Fig. 5. Images of 3B4 (A-B), 3D6 (C-D) and 3B4a (E-F) under light (left column) and dark field (right column) obtained from a polarized light microscope. The red circles in B and E indicate the substance 3B4 and the polymorphism of 3B4a, respectively.

In the dark field (**Fig. 5B**) no multicolored mass was observed, indicating an isotropic profile. 3D6 (**Fig. 5C-D**) shows crystalline characteristics and a greenish color (**Fig. 5D**), indicating an anisotropic profile. Substance 3B4a appears as a polymorph, with a small crystal in its structure (**Fig. 5E**). Dark field analysis shows that 3B4a is isotropic since no visible multicolored mass was observed (**Fig. 5F**). The image analysis provides evidence that 3B4 is an amorphous substance, which may explain its better solubility when compared to 3B4a and 3D6. According to Allen et al. (2013), the energy required for the molecule to escape from a crystal is much greater than that needed for an amorphous solid. Therefore, amorphous compounds are more soluble than its corresponding crystalline forms.

The solubility analysis of the urease inhibitors showed that the polarity and morphological characteristics of these substances were important for determining solubility. Additionally, the three substances were shown to be sensitive to certain types of media (acid-3D6, basic-3B4 and oxidant-3B4a). Although these media have shown influence on the substances studied, it is important to emphasize those drastic conditions of acidity, basicity and oxidation were tested; not corresponding to conditions to be used in the development of the formulation. The objective was to challenge the substances to obtain evidence of the conditions in which they would be more sensitive. Determination of the pKa of substances would help to better understand their behavior in acid-base environments. Therefore, polarity was the main factor considered for the rationalization of a formulation for delivering the substances. In this context, substance 3B4 showed the best solubility profile, followed by 3B4a and 3D6 (3B4 > 3B4a > 3D6). 3D6 was chosen as the worst case due to its greater difficulty in solubilizing in the different media tested in order to develop a suitable formulation for all the substances in the study.

3.2 Evaluation of urease inhibition in soil and in vitro

Among the urease inhibitors tested, 3B4 was as efficient as NBPT and inhibited soil ureases by 55.0% on average (**Fig. 6A**; $p > 0.05$) followed by 3D6 and 3B4a. This lower antiureolytic activity of substance 3D6 is in accordance with the results described by Chaves-Silva et al. (2020). Notably, the imine 3B4 was roughly twice as much potent as the corresponding amine 3B4a (**Fig. 6A**; $p < 0.05$).

The most potent substance in soil, 3B4, and the corresponding amine were chosen for the *in vitro* tests with urease from *C. ensiformis*. The antiureolytic activity of the substances 3B4 and 3B4a at 50 μM showed no statistically significant difference between them (22.6 ± 6.9 and 24.2 ± 9.6 , respectively). Both were similar to that of the reference inhibitor hydroxyurea (HU) (**Fig. 6B**).

The difference between the activity of 3B4 and 3B4a, comparing the results *in vitro* and in soil, suggests that substance 3B4a is protonated at the pH of the soil and due the presence of colloids, it is more retained, decreasing its availability to act as a urease inhibitor. Colloids are mainly responsible for the chemical activity of the soil. They have a negative net charge that can attract and retain positively charged particles (Lopes, 1998). However, in *in vitro* assay, the influence of the soil matrix is inexistent showing only the activity of 3B4a substance in contact with the enzyme urease. Thus, the molecular docking study was proposed to explain what are the most important groups for substances 3B4 and 3B4a to act as urease inhibitors.

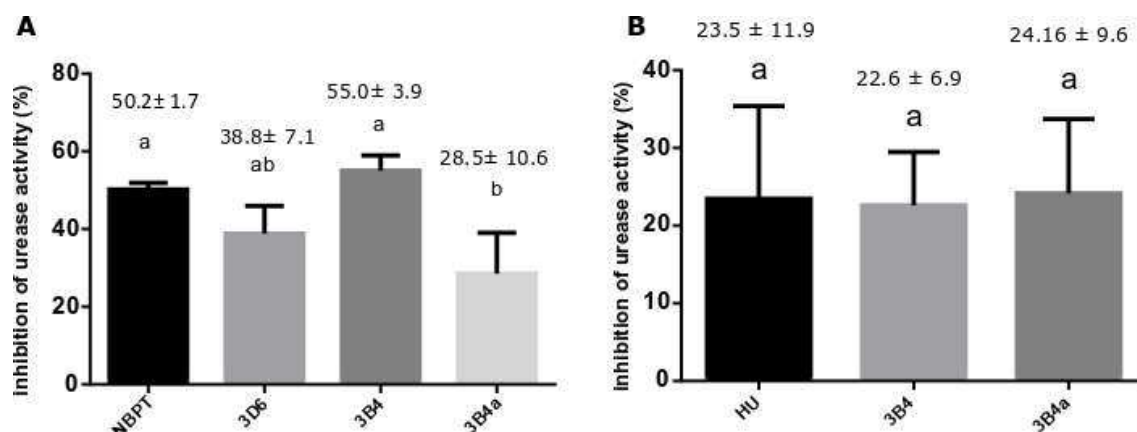


Fig. 6. Effect of imines and amine 3B4a on soil (A) and *Canavalia ensiformis* (B) ureases. Hydrozyurea (HU) was used as reference of urease inhibitor. Data were analyzed by one-way ANOVA with Tukey post-test at a significance level of 5%. Distinct letters represent statistically differences.

3.3 Molecular docking

The docking study with the active compounds 3B4 and 3B4a was performed as described in item 2.5. The compounds were analyzed in terms of orientation in the active site and the possibility of coordination with the two nickel ions. For 3B4 and 3B4a, it was observed that the orientation of the 3-OH in 3B4 and 4-OH in 3B4a aromatic ring play an important role in the coordination with the bi-nickel center of the enzyme active site (**Fig. 7**) (Braga et al., 2019). 3B4 and 3B4a show π -Cation interaction with Arg609, and π -Alkyl interactions with Ala440 and Ala636. Further stability was achieved for 3B4a due to the formation of a hydrogen bond between His593 and the amine group. Others two hydrogen bonds involving hydroxyl groups and the residues Ala436, Arg439 and Asp633 were observed in the interaction between 3B4a and urease. The best docking positions also showed other interactions with key residues in the active pocket, such as π -Anion, π - π or π -S, which contributed to the stability of the complexes formed. Thus, when compared to substance 3B4, substance 3B4a forms a more stable complex with the enzyme

urease. However, further studies on the enzymatic kinetics of these substances with the urease enzyme are needed to clarify the importance of this more stable complex with the 3B4a substance.

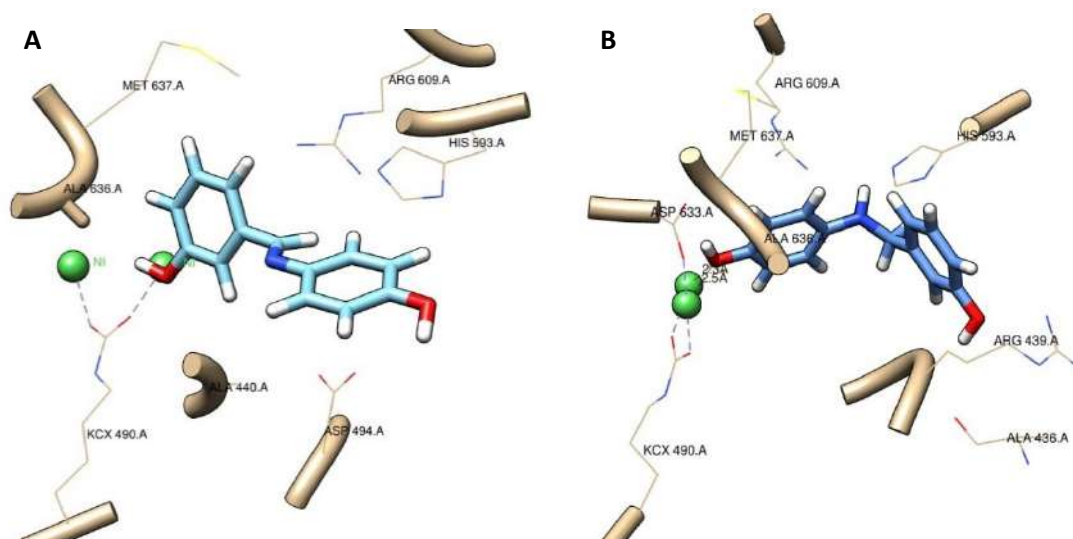


Fig.7. Predicted conformations of compounds 3B4 (A) and 3B4a (B) inside the binding pocket of *Canavalia ensiformis* urease. The green spheres indicate the nickel atoms (Ni) in the active site.

3.4 Interaction between 3B4 and urea

FTIR is a technique that can be used to verify the interaction between assets and excipients, and the reduction in the intensity or suppression of a peak and emergence of new peaks are evidence of interaction (Liltorp et al., 2011). **Fig. 8A** shows the spectrum obtained for urea (U), 3B4 (I-1) and the mixture urea + 3B4 (1:1) is registered at 0 (UI1-0h), 24 h (UI1-24h) and after 48 h (UI1-48h) whereas **Fig. 8B** shows the corresponding spectra for 3B4a. A stretching band characteristic of the N-H bond at 3428-3429 and 3328–3329 cm^{-1} , a bending band of this bond at 1588–1589 cm^{-1} and stretching bands for the C=O and C-N bond at 1673–1674 cm^{-1} and 1457 cm^{-1} , respectively, are observed for urea. The 3B4 spectrum (**Fig. 8A**) show a characteristic stretching band of the O-H bond at 3321 cm^{-1} . Stretching bands from the C=N and C=C bonds are also observed at 1622, 1583, 1505 and 1456 cm^{-1} . For

3B4a (**Fig. 8B**), a typical stretching band of the N-H bond at 3256 cm^{-1} is observed. The stretching band for the O-H bond is likely covered by the N-H stretching band. There is a bending band of the N-H aromatic secondary amine bond at 1516 cm^{-1} and stretching bands from C=C bonds at $1472\text{--}1451\text{ cm}^{-1}$.

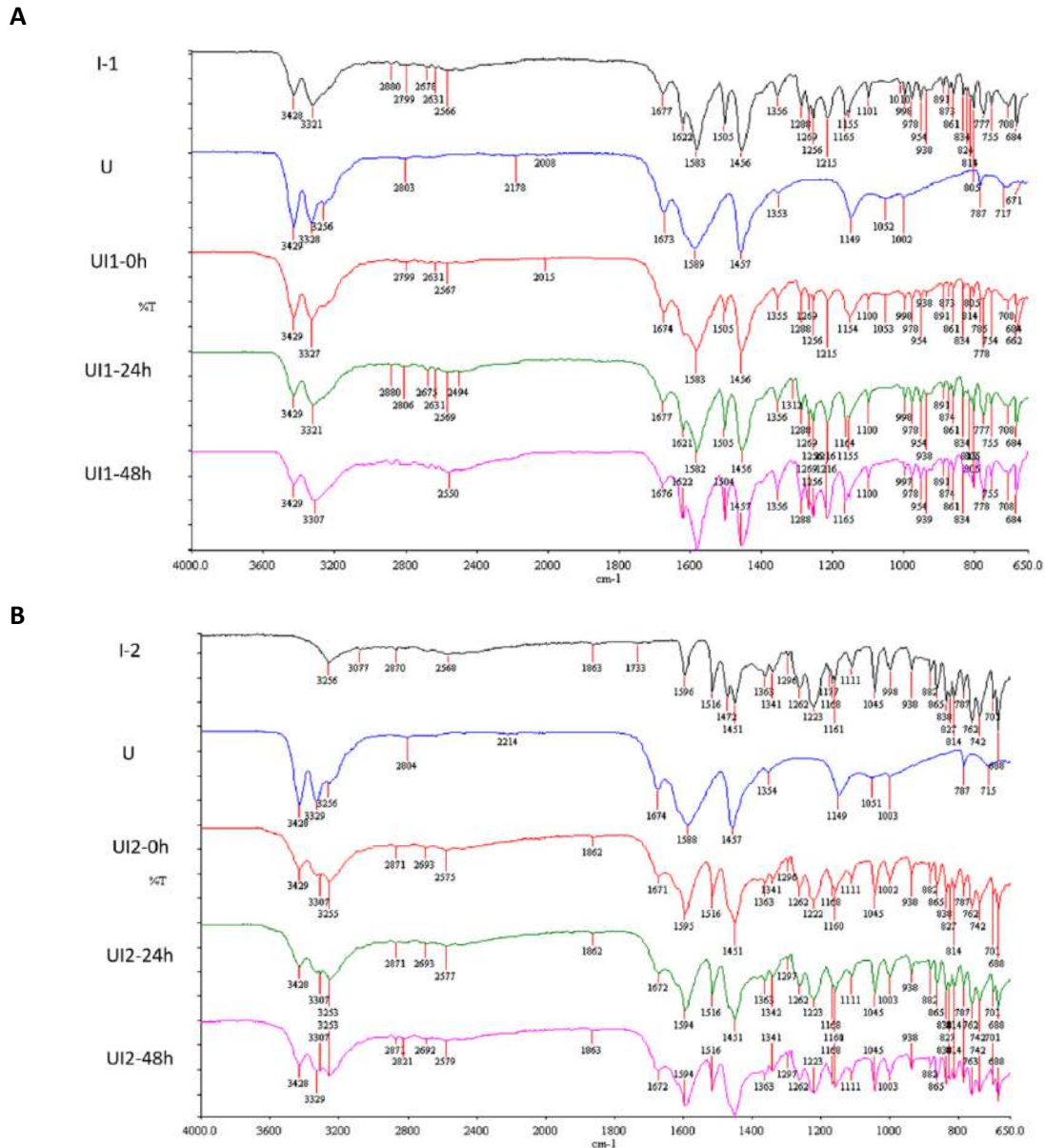


Fig. 8. (A) Spectrum obtained for urea (U), substance 3B4 (I-1) and the mixture urea plus 3B4 (1:1) at 0 (UI1-0h), 24 h (UI1-24h) and 48 h (UI1-48h) after preparation of the solutions. (B) Spectrum obtained for urea (U), substance 3B4a (I-2) and the mixture urea plus 3B4a (1:1) at 00 (UI2-0h), 24 h (UI2-24h) and 48h (UI2-48h) after preparation of the solutions.

No changes in the spectrum was recorded when equal amounts of both inhibitors were added to the urea, regardless of the time of incubation of solutions at room temperature. Some bands were masked by other of more intensity such as the stretching of the O-H bond in the imine 3B4 and the stretching bands from C=C bond the amine 3B4a. Overall, no interaction between urea and 3B4 or 3B4a was observed at the experimental conditions tested.

3.5 Development of a safe formulation to convey urease inhibitors in germination test

Although the set of results indicate substances 3B4 and 3B4a as the most promising urease inhibitors, since substance 3D6 was the most insoluble, it was selected as a reference for the screening of solvents and cosolvents to be used for the development of a hydrophilic formulation (**Table 1**). **Table 3** and **Fig. 9** illustrate the degree of 3D6 solubility as a function of varied combinations of solvents. Undeniably, lower proportions of EtOH (**Table 1**: Solutions 2, 3 and 8) resulted in a lower solubility profile while the solubility increased with the increment of EtOH in the solution (**Fig. 9**).

The log P for 3D6 substance, determined using ChemSketch® 2018 software (Advanced Chemistry Development, 2019), is 3.54 ± 0.50 , which reveals high hydrophobic character for 3D6. This is the reason by which PEG-400 was a better solvent than PROP for the solubilization of 3D6. PEG-400 has a long nonpolar chain enable to stablish more hydrophobic interactions with 3D6 (Babu et al., 2008; Seedher and Bhatia, 2003). Solutions 1, 4, 5 and 7 efficiently dissolved 3D6 (**Table 3**). The use of solution 1 was ruled out due to the relatively high EtOH content, determined to negatively affect the germination of lettuce seeds. The lack of PROP,

a humectant that counteracts the drying effect of surfactants (Johansson and Somasundaran, 2007), made solution 7 not suitable for use in the formulation. PROP attracts and bind to water molecules, controlling their levels in the medium (Schueller and Romanowski, 1999). However, concentrations of PROP higher than 25% did not provide good solubilization of 3D6 (**Fig. 9; Table 3; Solutions 3, 6 and 8**). PROP is the most polar among the three cosolvents evaluated, with a dielectric constant (ξ) of 32.0, whereas EtOH and PEG-400 show ξ equal to 24.3 and 12.4, respectively (Babu et al., 2008; Seedher and Bhatia, 2003). Solubility is largely influenced by the polarity of the solute and the solvent; and larger dielectric constants are related to more polar compounds (Gremião and Castro, 1999).

Table 3. Classification of substance 3D6 solubility profiles in the first screening using different proportions of ethanol (EtOH), polyethylene glycol 400 (PEG 400) and propylene glycol (PROP).

Solutions	EtOH (%)	PEG-400 (%)	PROP (%)	Solubility
1	90	5	5	1
2	5	90	5	2
3	5	5	90	3
4	50	25	25	1
5	25	50	25	1
6	25	25	50	3
7	50	50	0	1
8	0	50	50	3
9	50	0	50	2

* Solubility 1: fully soluble (no visible precipitate); solubility 2: intermediate solubility (still precipitated, but less than initial); Solubility 3: poorly soluble or insoluble (presence of precipitation corresponding to or near initial amount).

Solutions 4 and 5 were equally efficient in the solubilization of 3D6 although the former did it fastly likely due to higher EtOH conten. Moreover, solution 5 presented higher viscosity due to the higher proportion of PEG-400, which has a higher viscosity among the evaluated excipients: 105-130 cp (PEG-400); 58.1 cp (PROP) and 1.22 cP (EtOH) (Rowe et al., 2006). Higher viscosities difficult the cavitation

process (Capelo-Martínez, 2009) requiring longer sonication time to completely dissolve 3D6. Since both formulations provided a good solubilization profile, they were chosen to be submitted to the safety test using lettuce seeds.

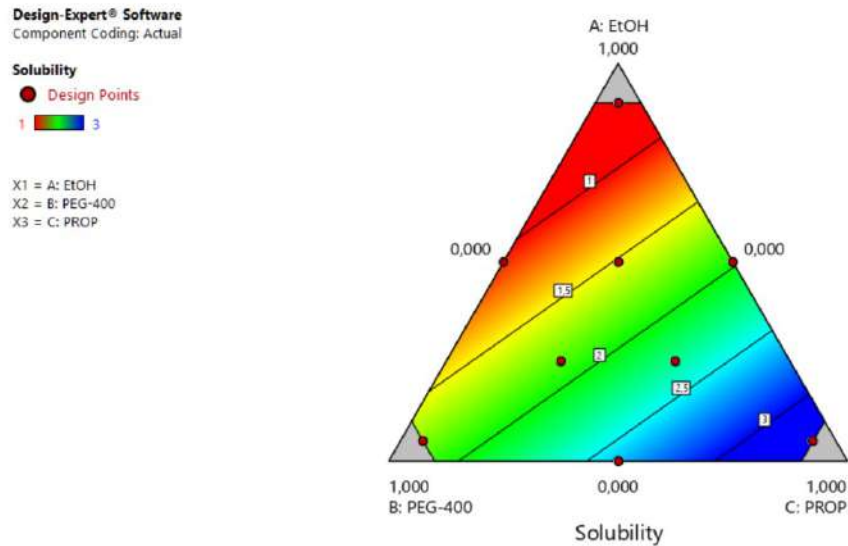


Fig. 9. Response surface for the first screening for formulation development. Ethanol (EtOH) increases the solubility of 3D6 (red response surface area) while propylene glycol (PROP) impairs the solubility (blue response surface area). Image was obtained using Design-Expert® software (STAT-EASE, 2018).

3.6 Assessment of the safety of formulations without urease inhibitors on seed germinations

Solutions 4 and 5, without inhibitors, were diluted 50 times (Solution 4DIL and 5DIL) and tested on the germination of lettuce seeds (**Table 4**). Although both solutions negatively affected lettuce seed germination, only solution 4DIL was statistically different from distilled water ($p = 0.0025$). For this reason, further studies were carried out solely with formulations containing solution 5DIL.

The effect of the 5DIL solution (without inhibitors) on other seed/seedling characteristics was also investigated, with results similar to those of the control treatment (**Table 5**). However, as the treatment with the 5DIL solution resulted in

higher standard deviations, another screening was proposed (**Table 1**), where DMSO was added as a co-solvent (solution 10).

Table 4. Effect of solutions 4DIL and 5DIL in comparison to distilled water (control) on the number of germinated lettuce seeds.

Treatment	Number of germinated seed
Distilled water (control)	23.70 ± 1.53 ^a
Solution 4DIL	8.00 ± 1.00 ^b
Solution 5DIL	19.00 ± 5.29 ^a

Results are the means ± standard deviation (n = 3 plates, each containing 25 seeds). ANOVA One-way with Tukey post-test. Distinct letters represent significant difference between the evaluated parameters (p <0.05). Solution 4DIL contained 1% EtOH, 0.5% PEG-400, 0.5% PROP and 98% distilled water. Solution 5DIL contained 0.5% EtOH, 1% PEG-400, 0.5% PROP and 98% distilled water.

The use of DMSO in agricultural formulations is allowed and such solvent is known to solubilize substances that poorly dissolve in water (Bettiol et al., 2016; Elakovich, 1999; Dakshini et al., 1999; EPA, 2019). Surfactants were also included in the third screening as it follows: Tween 20® (solution 11), Tween 60® (solution 12) and Triton X-100® (solution 13). Surfactants are commonly used in pesticide, herbicide and seed coating formulations and may act as a solubilizing agent for poorly soluble substances (Gálvez et al., 2019; Horowitz and Givelberg, 1979; Rowe et al., 2006). These new formulations were also evaluated for the ability to solubilize 3D6 and provided very good results.

The best results were achieved (healthier seedlings) when solutions 5DIL and 10 were used (**Fig. 10**). Solution 12 was detrimental to the development of lettuce seedlings in comparison with the control treatment (p = 0.0326; **Table 6; Fig. 10D**). Solutions 11 and 13, which contained, respectively, Tween 20® and Triton X-100®, did not affect seed germination, but impaired root growth (**Fig. 10C and E**), possibly due to an osmotic effect of these components.

Table 5. Effect of solution 5DIL in comparison to distilled water (control) on the germination of lettuce seeds and growth of lettuce seedlings.

Plant traits	Distilled water (control)	Solution 5DIL
Root Length (mm)	31.01±3.50 ^a	21.42±8.71 ^a
Germination percentage (%)	94.67±6.11 ^a	76.00±21.17 ^a
Germination Speed Index	21.05±1.00 ^a	15.75±6.97 ^a
Average germination time (days)	1.23±0.11 ^a	1.42±0.32 ^a
Average germination speed (/ day)	0.81±0.07 ^a	0.72±0.16 ^a
T50	0.63±0.05 ^a	0.87±0.42 ^a

Results are the means ± standard deviation (n = 3 plates each containing 25 seeds). Test t at a significance level of 0.05. Distinct letters represent significant difference between the evaluated parameters. Solution 5DIL contained 0.5% EtOH, 1% PEG-400, 0.5% PROP and 98% distilled water. T50, average germination time of 50% of the seeds.

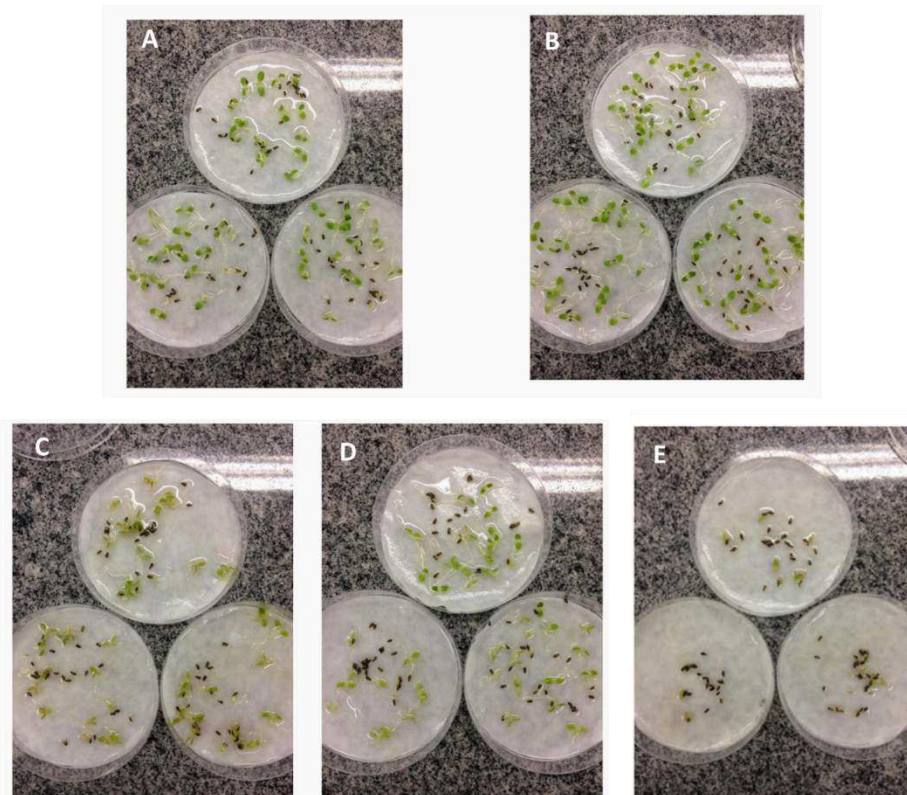


Fig. 10. Evaluation of germination of lettuce seeds treated with formulations without urease inhibitors. Images were taken 6 days after the beginning of the experiment. (A) solution 5DIL (0.5% EtOH, 1% PEG-400, 0.5% PROP and 98% distilled water), (B) solution 10 (0.25% DMSO, 0.25% EtOH, 1% PEG-400, 0.5% PROP and 98% distilled water), (C) solution 11 (0.5% EtOH, 1% Tween 20®, 0.5% PROP and 98% distilled water), (D) solution 12 (0.5% EtOH, 1% Tween 60®, 0.5% PROP and 98% distilled water) and (E) solution 13 (0.5% EtOH, 1% Triton X-100®, 0.5% PROP and 98% distilled water).

Tween 80® (1% v/v) was shown to negatively affect the germination of lettuce seeds and the development of seedlings (Santos et al., 2004). Although in solutions 11, 12 and 13 the surfactant concentration was lower (0.01% v/v), a negative impact of these excipients was observed for lettuce seed germination. Galv ez et al. (2019) also evaluated the effect of surfactants (anionic or nonionic) on the germination of lettuce seeds and in general was observed that they had a negative effect on germination percentage, fresh and dry biomass, and root length when tested at 32.5 g/L concentration. According to Horowitz and Givelberg (1979) nonionic surfactants can affect root permeability and disrupt the growth of the entire plant. Consequently, surfactants were withdrawn from the formulations, maintaining PEG-400 and changing DMSO and EtOH concentrations.

Table 6. Effect of the solutions 5DIL, 10, 11, 12 and 13 comparison to distilled water (control) on the number of germinated lettuce seeds.

Treatment	Number of germinated seeds
Distilled water (control)	23.7 ± 1.5
Solution 5DIL	22.0 ± 1.0
Solution 10	22.0 ± 1.0
Solution 11	20.0 ± 1.0
Solution 12	17.3 ± 3.5*
Solution 13	19.3 ± 2.9

Results are means ± standard deviation . Results were evaluated by One-way ANOVA with Tukey post-test at a significance level of 0.05 (* p <0.05). Solution 5DIL (0.5% EtOH, 1% PEG-400, 0.5% PROP and 98% distilled water); solution 10 (0.25% DMSO, 0.25% EtOH, 1% PEG-400, 0.5% PROP and 98% distilled water); solution 11 (0.5% EtOH, 1% Tween 20®, 0.5% PROP and 98% distilled water); solution 12 (0.5% EtOH, 1% Tween 60®, 0.5% PROP and 98% distilled water); Solution 13 (0.5% EtOH, 1% Triton X-100®, 0.5% PROP and 98% distilled water).

Other response factors obtained for solution 10 and solution 5DIL (most promising formulations of the third screening) are illustrated in **Table 7**. Although both solutions provided germination rates comparable to the control the germination process was

slower and the resulting seedlings showed smaller roots. Since solution 10 resulted in a smaller difference for all evaluated traits, it was selected for subsequent studies. Several proportions of DMSO (fourth screening; **Table 1**) were investigated in an effort to improve the formulation safety. The results obtained are shown in **Table 8** and **Fig. 11**. All germinated seeds provided healthy seedlings regardless of the treatment, which indicates that any of the tested formulations are safe (**Fig. 11**). No statistical differences were observed for average germination time, T50, dry weight and root length ($p > 0.05$). The absence of difference in T50 and average germination time (AGT) show that solutions 14, 15 and 16 promoted seed germination at similar time to control group. However, an increase in germination time was observed with the increase of DMSO and EtOH concentration. Solution 14 (lower EtOH and DMSO concentration) showed the best results when compared to control group. The T50 was 6.8%, and the AGT 13.4% greater than control (T50: $p = 0.80$; AGT: $p = 0.58$).

Table 7. Effect of solution 5DIL and 10 in comparison to distilled water (control) on the germination of lettuce seeds and growth of lettuce seedlings.

Plant traits	Distilled water (control)	Solution 5DIL	Solution 10
Number of germinated seeds	23.7 ± 1.53 ^a	22.00±1.00 ^a	22.00±1.00 ^a
Root Length (mm)	31.01 ± 3.50 ^a	16.25±1.63 ^b	24.11± 2.06 ^c
Germination percentage (%)	94.67 ± 6.11 ^a	88.00±4.00 ^a	88.00±4.00 ^a
Germination Speed Index	21.05 ± 1.00 ^a	9.56±0.54 ^b	12.36±0.84 ^c
Average germination time (days)	1.23 ± 0.11 ^a	2.71±0.06 ^b	2.14±0.33 ^c
Average germination speed(/day)	0.81±0.07 ^a	0.37±0.01 ^b	0.47±0.08 ^b
T50	0.63±0.05 ^a	1.73±0.08 ^b	1.45±0.11 ^b

Results are the means ± standard deviation (n = 3 plates each containing 25 seeds). ANOVA One-way with Tukey post-test. Distinct letters represent significant difference between the evaluated parameters ($p < 0.05$). Solution 5DIL contained 0.5% EtOH, 1% PEG-400, 0.5% PROP and 98% distilled water; solution 10 contained 0.25% DMSO, 0.25% EtOH, 1% PEG-400, 0.5% PROP and 98% distilled water. T50, average germination time of 50% of the seeds.

Regarding the germination speed index (GSI), it was observed that the solution 15 was 14.1%, and the solution 16 was 16.0%, less than the control. For average

germination speed (AGS), solution 15 was 20.2%, and the solution 16 was 21.4%, less than control. These results provide evidence that these solutions interfered with the germination speed of lettuce seeds. Regarding the percentage of germinated seeds, at the end of 7 days, the only treatment that was statistically different from the control solution was solution 16 ($p = 0.007$), indicating a negative effect on lettuce seeds (**Table 8**). Thus, the solution that was not detrimental to lettuce seeds and seedlings in the fourth screening was solution 14. Notably, solution 14 was able to solubilize the urease inhibitors studied herein.

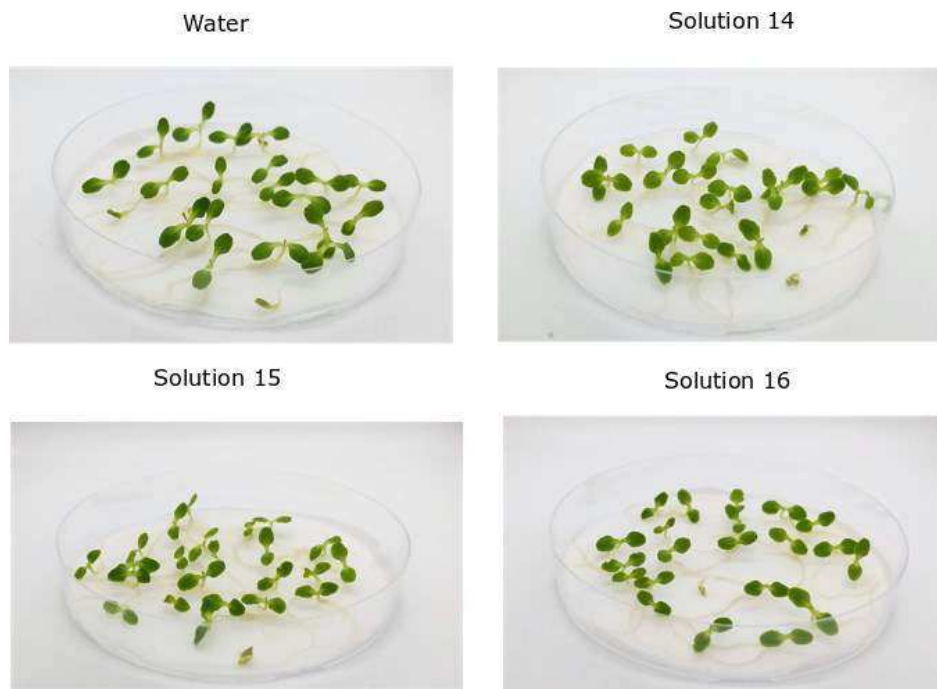


Fig. 11. Seven-days old lettuce (*Lactuca sativa* L.) seedlings originated from seeds germinated in the presence of solutions 14, 15, 16. Solution 14 contained 0.05% EtOH, 0.05% DMSO, 1.4% PEG-400, 0.5% PROP and 98% distilled water; solution 15 contained 0.05% EtOH, 0.15% DMSO, 1.3% PEG-400, 0.5% PROP and 98% distilled water; solution 16 contained 0.1% EtOH, 0.1% DMSO, 1.3% PEG-400, 0.5% PROP and 98% distilled water.

According to Elakovich (1999), small amounts of EtOH and DMSO are used to aid the solubility of samples. In our study, EtOH was not as good a solvent for inhibitors as DMSO. The addition of DMSO was necessary to increase the bioavailability of

urease inhibitors. Bettiol et al. (2016) described a smaller negative impact for DMSO (2% v/v) compared to EtOH (0.01% v/v) on germination rates, similar to what was observed in our studies. Therefore, at lower concentrations (0.0005% v/v), EtOH and DMSO resulted in a non-phytotoxic formulation in germination testing. PEG-400 and DMSO were essential to promote the solubilization of urease inhibitors and to reduce the EtOH concentration in the formulation. The literature shows that PEG-400 can be absorbed by plants. According to Janes (1974), no sign of root damage was observed when PEG-400 was inserted into the nutrient medium in an experiment with pepper (*Capsicuitn annuum* L. var. California Wonder). It was also observed that PEG entered the plant through intact roots. The amount of PEG accumulated in the leaves was only a small fraction contained in the nutrient solution, with no relationship between the amount of accumulated PEG and the sweating rate; change in the molecular distribution of each polymer as it moved from the solution to the sheets; or evidence of any absorption that could be associated with mass water flow. Lawlor (1970) concluded that the presence of higher molecular weight PEG in leaves caused necrosis in a way that could not be reproduced by low molecular weight PEG. The PEG-200, although absorbed, did not cause short-term damage. According to Kaufmann and Eckard (1971), when PEG-400 was added to a nutrient medium, there was a reduction in the osmotic potential in the xylem sap of the pepper root. However, half of this adjustment was attributed to increased accumulation of ions (K^+ , Na^+ Ca^{2+} and Mg^{2+}) in the root xylem (Kaufmann and Eckard, 1971). Thus, we can observe that PEG-400 can be absorbed by plants, but results in smaller changes when compared to high molecular weight PEGs. It is important to emphasize that in our studies there was no addition of nutrients, which also influences the osmotic potential. Additionally, the concentration of this excipient in the solubilizing solution is

low. The measurement of other plant physiological factors, in addition to those studied in this work, can provide more information about the safety of this solution. However, in principle, PEG was a safe excipient, as shown in the results presented here.

Table 8. Effect of solutions 14, 15 and 16 in comparison to distilled water (control) on the germination of lettuce seeds and growth of lettuce seedlings.

Plant traits	Distilled water (Control)	Solution 14	Solution 15	Solution 16
Number of germinated seeds	24.8±0.4 ^a	23.2±0.8 ^{ab}	22.4±1.9 ^{ab}	21.4±1.7 ^b
Root Length (mm)	37.3±3.5 ^a	33.5±0.5 ^a	35.9±2.4 ^a	36.2±1.6 ^a
Fresh weight (g)	0.29±0.02 ^{ab}	0.30±0.01 ^a	0.27±0.03 ^{ab}	0.26±0.01 ^b
Dry weight (g)	0.017±0.002 ^a	0.02±0.001 ^a	0.018±0.002 ^a	0.019±0.002 ^a
Germination percentage (%)	99.2±1.79 ^a	94.3±2.13 ^{ab}	91.8±7.62 ^{ab}	87.6±5.24 ^b
Germination Speed Index	22.75±1.12 ^a	20.37±1.15 ^{ab}	19.53±2.60 ^b	18.08±1.40 ^b
Average germination time (days)	1.19±0.11 ^a	1.35±0.16 ^a	1.53±0.26 ^a	1.56±0.23 ^a
Average germination speed (/day)	0.84±0.07 ^a	0.75±0.09 ^{ab}	0.67±0.71 ^b	0.66±0.09 ^b
T50	0.59±0.05 ^a	0.63±0.05 ^a	0.64±0.10 ^a	0.67±0.07 ^a

Results are the means ± standard deviation (n = 5 plates each containing 25 seeds). Distinct letters represent significant difference between the evaluated parameters (p <0.05). Data were evaluated by one-way ANOVA (Tukey post-test). Solution 14 contained 0.05% EtOH, 0.05% DMSO, 1.4% PEG-400, 0.5% PROP and 98% distilled water; solution 15 contained 0.05% EtOH, 0.15% DMSO, 1.3% PEG-400, 0.5% PROP and 98% distilled water; solution 16 contained 0.1% EtOH, 0.1% DMSO, 1.3% PEG-400, 0.5% PROP and 98% distilled water.

The germination test was used to identify different levels of phytotoxicity in samples, but one of the main problems of this test is the delivery of non-water soluble substances (Elakovich, 1999; Valerio et al., 2007). Unfortunately, phytotoxicity studies lack this kind of assessment, and usually the solvents included in germination

tests are not really tested for the safety (Bettiol et al., 2016). The here presented findings clearly show the importance of the safety evaluation of excipients used in formulations for agricultural products.

4 CONCLUSION

In this work it was possible to obtain evidence of the solubility, morphology and reactivity of the Schiff Bases 3B4 and 3D6, as well as the amine 3B4a. Among these substances, 3B4 and 3B4a were the most promising, presenting important functional groups for the inhibition of the urease enzyme (3-OH in 3B4 and 4-OH in the aromatic ring 3B4a). No interactions of 3B4 and 3B4a with urea were observed, which may favor the inclusion of these substances in a fertilizer with urea. The developed formulation proved to be suitable for the solubilization of all proposed urease inhibitors and was not phytotoxic to lettuce seeds.

SUPPORTING INFORMATION

Table S1: Descriptive terms for the classification of approximate solubility.

<i>Descriptive Terms</i>	<i>Part of solvent required per 1 part of solute</i>
<i>Very soluble</i>	Less than 1
<i>Freely soluble</i>	From 1 to 10
<i>Soluble</i>	From 10 to 30
<i>Sparingly soluble</i>	From 30 to 100
<i>Slightly soluble</i>	From 100 to 1,000
<i>Very slightly soluble</i>	From 1,000 to 10,000
<i>Practically insoluble, or insoluble</i>	Greater than or equal to 10,000

Source: adapted from USP, 2015.

ABBREVIATIONS

ACN acetonitrile; AGS, average germination speed; AGT, average germination time; EtOH, ethanol; DMSO, dimethyl sulfoxide; EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; FTIR, Fourier Transform Infrared Spectroscopy; GSI, germination speed index; HU,

hydroxyurea; MD, molecular dynamics; MeOH, methanol; NBPT, *N*-(butyl) thiophosphoric triamide; NMR, Nuclear Magnetic Resonance; PEG-400, polyethylene glycol 400; PME, particle-mesh Ewald; PROP, propylene glycol; T50, average germination time of 50% of the seeds.

FUNDING SOURCES

This study was financed in part by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

REFERENCES

- Advanced Chemistry Development, I., 2019. ACD/ChemSketch.
- Allen J.R., Loyd V., Popovich, N. G., Ansel, H.C., 2013. Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos, 9^a. ed. Artmed Editora.
- Artola, E., Cruchaga, S., Ariz, I., Moran, J.F., Garnica, M., Houdusse, F., Mina, J.M.G., Irigoyen, I., Lasa, B., Aparicio-Tejo, P.M., 2011. Effect of *N*-(*n*-butyl) thiophosphoric triamide on urea metabolism and the assimilation of ammonium by *Triticum aestivum* L. *Plant Growth Regul.* <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9513-6>
- Babu, P.R.S., Subrahmanyam, C.V.S., Thimmasetty, J., Manavalan, R., Valliappan, K., Kedarnath, S.A., 2008. Solubility enhancement of cox-II inhibitors by cosolvency approach. *Dhaka Univ. J. Pharm. Sci.* <https://doi.org/10.3329/dujps.v7i2.2166>
- Bettiol, C., De Vettori, S., Minervini, G., Zuccon, E., Marchetto, D., Ghirardini, A.V., Argese, E., 2016. Assessment of phenolic herbicide toxicity and mode of action by different assays. *Environ. Sci. Pollut. Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5958-5>
- Blennerhassett, J.D., Quin, B.F., Zaman, M., Ramakrishnan, C., 2006. The potential for increasing nitrogen responses using Agrotain treated urea. *Proc. New Zeal. Grassl.*

Assoc.

- Bonasera, J., Lynch, J., Leck, M.A., 1979. Comparison of the Allelopathic Potential of Four Marsh Species. *Bull. Torrey Bot. Club.* <https://doi.org/10.2307/2484557>
- Braga, T.C., Silva, T.F., Maciel, T.M.S., Da Silva, E.C.D., Da Silva-Júnior, E.F., Modolo, L.V., Figueiredo, I.M., Santos, J.C.C., De Aquino, T.M., De Fátima, Â., 2019. Ionic liquid-assisted synthesis of dihydropyrimidin(thi)one Biginelli adducts and investigation of their mechanism of urease inhibition. *New J. Chem.* <https://doi.org/10.1039/c9nj03556g>
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009. Regras para análise de sementes/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa). Secretaria de Defesa Agropecuária.
- Brito, T.O., Souza, A.X., Mota, Y.C.C., Morais, V.S.S., De Souza, L.T., De Fátima, Â., Macedo, F., Modolo, L. V., 2015. Design, syntheses and evaluation of benzoylthioureas as urease inhibitors of agricultural interest. *RSC Adv.* <https://doi.org/10.1039/c5ra07886e>
- Byung, T.C., Sang, K.K., 2005. Direct and indirect reductive amination of aldehydes and ketones with solid acid-activated sodium borohydride under solvent-free conditions. *Tetrahedron.* <https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.04.039>
- Cantarella, H., Soares, J. R., Sousa, R. M., Otto, R., Sequeira, C., 2016. Stability of urease inhibitor added to urea., in: Melbourne, Australia: 2016 International Nitrogen Initiative Conference: Solutions to Improve Nitrogen Use Efficiency for the World.
- Cantarella, H., 2007. Nitrogênio, in: Novais, R.F. [et al.], 1ªed., Fertilidade Do Solo. Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, Viçosa, Minas Gerais, pp. 375–470.
- Cantarella, H., Otto, R., Soares, J.R., Silva, A.G. de B., 2018. Agronomic efficiency of NBPT as a urease inhibitor: A review. *J. Adv. Res.* <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.05.008>
- Capelo-Martínez, J.L., 2009. Ultrasound in Chemistry: Analytical Applications, *Ultrasound in Chemistry: Analytical Applications.* <https://doi.org/10.1002/9783527623501>
- Carey, F.A., Sundberg, R.J., 2007. Advanced Organic Chemistry Part A: Structure and Mechanisms, *Advanced Organic Chemistry.* <https://doi.org/10.1021/ed065pA139.2>

- Chaves-Silva, S., Horta, L.P., Souza, L.T., da Silva, C.M., Dohanik, C.S., Goulart, G.A.C., Marriel, I.E., de Fátima, Â., Modolo, L. V., 2019. Do schiff bases-based urease inhibitors improve plant growth and affect the activity of soil arginase? *Ind. Crops Prod.* 111995. In press. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111995>
- Clay, D.E., Malzer, G.L., Anderson, J.L., 1990. Division S-8. Fertilizer technology & use. Ammonia volatilization from urea as influenced by soil temperature, soil water content, and nitrification and hydrolysis inhibitors. *Soil Sci. Soc. Am. J.* <https://doi.org/10.2136/sssaj1990.03615995005400010042x>
- Creason, G.L., Schmitt, M.R., Douglass, E.A., Hendrickson, L.L., 1990. Urease inhibitory activity associated with N-(n-butyl)thiophosphoric triamide is due to formation of its oxon analog. *Soil Biol. Biochem.* 22. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(90\)90088-H](https://doi.org/10.1016/0038-0717(90)90088-H)
- Edmond, J. B., Drapala, W.J., 1958. The effects of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra seed. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 428–434.
- Elakovich, S.D., 1999. Bioassays Applied to Allelopathic Herbaceous Vascular Hydrophytes, in: Inderjit, K. M. M. D., Chester, L.F., 1^ªed, *Principles and Practices in Plant Ecology: Allelochemical Interactions.* p. 608.
- Engel, R., Williams, E., Wallander, R., Hilmer, J., 2013. Apparent Persistence of N -(n - butyl) Thiophosphoric Triamide Is Greater in Alkaline Soils . *Soil Sci. Soc. Am. J.* 77. <https://doi.org/10.2136/sssaj2012.0380>
- Engel, R.E., Towey, B.D., Gravens, E., 2015. Degradation of the urease inhibitor NBPT as affected by soil pH. *Soil Sci. Soc. Am. J.* <https://doi.org/10.2136/sssaj2015.05.0169>
- EPA, 2019. Approved for Food and Nonfood Use-Dimethyl sulfoxide. URL https://iaspub.epa.gov/apex/pesticides/f?p=INERTFINDER:3:::NO::P3_ID:6777 (accessed 12.5.19).
- Frazão, J.J., Silva, Á.R. da, Silva, V.L. da, Oliveira, V.A., Corrêa, R.S., 2014. Fertilizantes nitrogenados de eficiência aumentada e ureia na cultura do milho. *Rev. Bras. Eng. Agrícola e Ambient.* <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v18n12p1262-1267>
- Galloway, J.N., Cowling, E.B., 2002. Reactive nitrogen and the world: 200 Years of change,

- in: *Ambio*. <https://doi.org/10.1579/0044-7447-31.2.64>
- Gálvez, A., López-Galindo, A., Peña, A., 2019. Effect of different surfactants on germination and root elongation of two horticultural crops: implications for seed coating. *New Zeal. J. Crop Hortic. Sci.* <https://doi.org/10.1080/01140671.2018.1538051>
- Gesslein, B.W., 1999. Humectants in Personal Care Formulation: A Practical Guide, in: Schueller, R., Romanowski, P., 1^aed., *Conditioning Agents for Hair and Skin*. Marcel Dekker, Inc., New York, NY and Basel, Switzerland, pp. 95–110.
- Gremião, M. P. D., Castro, A.D., 1999. Considerações sobre o processo de dissolução na preparação de dispersões moleculares. *Infarma-Ciências Farm.* 7–11.
- Gruber, N., Galloway, J.N., 2008. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature06592>
- Horowitz, M., Givelberg, A., 1979. Toxic effects of surfactants applied to plant roots. *Pestic. Sci.* <https://doi.org/10.1002/ps.2780100616>
- IFA, 2019. Fertilizer Outlook 2019 – 2023, in: *Production & International Trade, Market Intelligence and Agriculture Services*. IFA Annual Conference, Montreal (Canada).
- Isherwood, K.F., 2000. O uso de fertilizantes minerais e o meio ambiente, International Fertilizer Industry Association, United Nations Environment Programme. Trad. Associação Nacional para Difusão de Adubos. Paris.
- Janes, B.E., 1974. The Effect of Molecular Size, Concentration in Nutrient Solution, and Exposure Time on the Amount and Distribution of Polyethylene Glycol in Pepper Plants. *Plant Physiol.* 54. <https://doi.org/10.1104/pp.54.3.226>
- Jiang, X., Li, W., Chen, G., Wang, L., 2017. Dynamic Perturbation of the Active Site Determines Reversible Thermal Inactivation in Glycoside Hydrolase Family 12. *J. Chem. Inf. Model.* <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00692>
- Kandeler, E., Gerber, H., 1988. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biol. Fertil. Soils.* <https://doi.org/10.1007/BF00257924>
- Kaufmann, M.R., Eckard, A.N., 1971. Evaluation of Water Stress Control with Polyethylene Glycols by Analysis of Guttation. *Plant Physiol.* 47. <https://doi.org/10.1104/pp.47.4.453>

- Klein, Ken; Palefsky, I., 2007. Shampoo Formulation, in: Johansson, Ingegard, Somasundaran, P. (Ed.), Handbook for Cleaning/Decontamination of Surfaces. Elsevier.
- Krajewska, B., 2009. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. J. Mol. Catal. B Enzym. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.01.003>
- Lawlor, D.W., 1970. Absorption of polyethylene glycols by plants and their effects on plant growth. New Phytol. 69. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1970.tb02446.x>
- Lilitorp, K., Larsen, T.G., Willumsen, B., Holm, R., 2011. Solid state compatibility studies with tablet excipients using non thermal methods. J. Pharm. Biomed. Anal. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.02.016>
- Lopes, A.S., 1998. Manual internacional de fertilidade do solo, 2 ed. rev. ed. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, Piracicaba.
- Garside, 2019. Forecasted total urea fertilizer demand worldwide from 2014 to 2023 (in million metric tons). Statista. URL <https://www.statista.com/statistics/438995/total-demand-for-urea-fertilizer-worldwide-prediction/> (accessed 12.18.19).
- Matson, P.A., Parton, W.J., Power, A.G., Swift, M.J., 1997. Agricultural intensification and ecosystem properties. Science, 277, 5325, 504-509. <https://doi.org/10.1126/science.277.5325.504>
- Mccauley, A., Jones, C., Olson-Rutz, K., 2017. Soil pH and Organic Matter. Nutr. Manag.
- McLaughlin, M., 2009. Technical Bulletin: Fertilisers and Soil Acidity. Univ. Adelaide.
- Modolo, L. V., De Fátima, A., De Souza, L. T., Horta, L. P., Da Silva, C. M., Barbosa, G. M., Ferreira, L. B., Marriel, I.E., 2016. Pérolas de ureia combinadas com aldiminas, processo de obtenção e usos na agricultura, e aplicações das aldiminas no tratamento de infecções bacterianas. WO/2016/174648.
- Pereira, C.P., 2019. Estudos in vitro de interações da enzima urease com compostos inibidores empregando espectroscopia de fluorescência molecular. Universidade Federal de Minas Gerais.
- Peters, N., Thiele-Bruhn, S., 2022. Major metabolites of NBPT degradation pathways contribute to urease inhibition in soil. Chemosphere 303.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135163>

- Pronk, S., Páll, S., Schulz, R., Larsson, P., Bjelkmar, P., Apostolov, R., Shirts, M.R., Smith, J.C., Kasson, P.M., van der Spoel, D., Hess, B., Lindahl, E., 2013. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics* 29, 845–854. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt055>
- Roberts, J. D., Caserio, M.C., 1977. *Basic Principles of Organic Chemistry*, 2^a. ed. WA Benjamin, Inc.
- Rothstein, S.J., 2007. Returning to our roots: Making plant biology research relevant to future challenges in agriculture. *Plant Cell*. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.053074>
- Rowe, R. C., Sheskey, P. J., Siân, C.O., 2006. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 5^a. ed, Pharmaceutical Press. Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association 2006.
- Rütting, T., Aronsson, H., Delin, S., 2018. Efficient use of nitrogen in agriculture. *Nutr. Cycl. Agroecosystems*. <https://doi.org/10.1007/s10705-017-9900-8>
- San Francisco, S., Urrutia, O., Martin, V., Peristeropoulos, A., Garcia-Mina, J.M., 2011. Efficiency of urease and nitrification inhibitors in reducing ammonia volatilization from diverse nitrogen fertilizers applied to different soil types and wheat straw mulching. *J. Sci. Food Agric.* 91. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4349>
- Sanner, M.F., 1999. Python: A programming language for software integration and development. *J. Mol. Graph. Model*.
- Santos, C.C. dos, Oliveira, D.F. de, Alves, L.W.R., Souza, I.F. de, Furtado, D.A.S., 2004. Efeito de extratos orgânicos, associados ao surfactante tween 80, na germinação e crescimento de plântulas de alface. *Ciência e Agrotecnologia*. <https://doi.org/10.1590/s1413-70542004000200007>
- Savjani, K.T., Gajjar, A.K., Savjani, J.K., 2012. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. *ISRN Pharm*. <https://doi.org/10.5402/2012/195727>
- Seedher, N., Bhatia, S., 2003. Solubility enhancement of cox-2 inhibitors using various solvent systems. *AAPS PharmSciTech*. <https://doi.org/10.1208/pt040333>

- Shoghi, E., Fuguet, E., Bosch, E., Ràfols, C., 2013. Solubility-pH profiles of some acidic, basic and amphoteric drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.10.028>
- Silva, M.M., Nascimento, E.O.O., Silva, E.F., Araújo, J.X. de, Santos, J.C.C., Figueiredo, I.M., Araújo, J.X. de, Santana, C.C., Grillo, L.A.M., de Oliveira, R.S., Buarque, C.D., Costa, P., 2017. Interaction between bioactive compound 11a-N-tosyl-5-deoxy-pterocarpan (LQB-223) and Calf thymus DNA: Spectroscopic approach, electrophoresis and theoretical studies. *Int. J. Biol. Macromol.* <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.044>
- Solomons, T. W. G., Fryhle, C.B., 2001. *Química orgânica*, 7ª. ed. LTC Editora, Rio de Janeiro, RJ.
- Soltani, E., Ghaderi-Far, F., Baskin, C.C., Baskin, J.M., 2015. Problems with using mean germination time to calculate rate of seed germination. *Aust. J. Bot.* <https://doi.org/10.1071/BT15133>
- Souza, C.R. de, Ohlson, O. de C., Gavazza, M.I.A., Panobianco, M., 2010. Tetrazolium test for evaluating triticale seed viability. *Rev. Bras. Sementes.* <https://doi.org/10.1590/s0101-31222010000300018>
- STAT-EASE, 2018. Design Expert software.
- Tasca, F.A., Ernani, P.R., Rogeri, D.A., Gatiboni, L.C., Cassol, P.C., 2011. Volatilização De Amônia do solo após a aplicação de ureia convencional ou com inibidor de urease. *Rev. Bras. Cienc. do Solo.* <https://doi.org/10.1590/S0100-06832011000200018>
- Trenkel, M.E., 2010. Slow-and controlled-release and stabilized fertilizers: An option for enhancing nutrient use efficiency in agriculture. Paris, France.
- U.S. National Library of Medicine, 2019. Aniline-Overview. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/43>
- USP, 2015. U.S. Pharmacopoeia-National Formulary [USP 35 NF 33]. Rockville, Md United States Pharmacopeial Conv.
- Valerio, M.E., García, J.F., Peinado, F.M., 2007. Determination of phytotoxicity of soluble

- elements in soils, based on a bioassay with lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Sci. Total Environ.* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.01.007>
- Vemula, V.R., Lagishetty, V., Lingala, S., 2010. Solubility enhancement techniques. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*
- Watson, C.J., Akhonzada, N.A., Hamilton, J.T.G., Matthews, D.I., 2008. Rate and mode of application of the urease inhibitor N-(n-butyl) thiophosphoric triamide on ammonia volatilization from surface-applied urea. *Soil Use Manag.* <https://doi.org/10.1111/j.1475-2743.2008.00157.x>
- Yamada, T., Abdalla, S.R.S., 2000. Como melhorar a eficiência da adubação nitrogenada do milho?, *Informações Agronômicas*. Piracicaba-SP, Brasil.
- Zanin, L., Tomasi, N., Zamboni, A., Varanini, Z., Pinton, R., 2015. The urease inhibitor NBPT negatively affects DUR3-mediated uptake and assimilation of urea in maize roots. *Front. Plant Sci.* <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01007>

5 CONCLUSÃO GERAL

Neste trabalho foi possível avançar nos estudos com os inibidores de urease prospectados (3D6, 3B4, 3B4a) e desenvolver uma formulação segura para veicular essas substâncias, a ausência de fitotoxicidade avaliada em sementes de alface (*Lactuca sativa* L.). Nos estudos de pré-formulação avaliamos a solubilidade dos inibidores em diversos solventes, os quais mostraram-se praticamente insolúveis em água e mais propensos à solubilização em solventes orgânicos (perfil de solubilidade: 3B4 > 3B4a > 3D6). Também foi possível obter evidências de que meios ácidos, básicos e oxidantes podem afetar as substâncias 3D6, 3B4 e 3B4a, respectivamente. Nos estudos de atividade antiureolítica a substância 3B4 apresentou melhor atividade antiureolítica em solo (3B4 > 3D6 > 3B4a). Porém, na avaliação *in vitro*, as substâncias 3B4 e 3B4a apresentaram atividades semelhantes. Nos estudos de *docking molecular* ambas as substâncias (3B4 e 3B4a) interagiram com o centro de bi-níquel da enzima, essencial para a atividade de inibição. No entanto, o complexo com 3B4a é mais estável devido às ligações de hidrogênio. Visto que os inibidores em estudos deverão ser incorporados à ureia para estudos posteriores, também avaliamos a interação da ureia com as substâncias 3B4 e 3B4a por FTIR nos tempos 0, 24 e 48 h. Os espectros de FTIR não mostraram evidências de interação, fornecendo um indício de estabilidade, importante para o desenvolvimento de uma formulação comercial.

Em suma, nós demonstramos ser possível desenvolver uma formulação segura para veiculação dos novos inibidores de urease prospectados, avançarmos nas avaliações da atividade antiureolítica dessas substâncias (*in vitro* e em solo) e no entendimento da interação dessas substâncias com a enzima urease. Como perspectiva, propomos a avaliação da estabilidade das substâncias mais promissoras (3B4 e 3B4a) em condições de stress (hidrólise, oxidação) para predição dos possíveis caminhos de degradação; e avaliação da segurança da substância 3B4a associada a formulação desenvolvida, uma vez que estudos anteriores do grupo mostraram que a 3B4 não provoca efeitos nocivos nas sementes de alface. Também pretendemos avaliar a eficiência dessas substâncias na mitigação da degradação da ureia no solo em estudos de volatilização.

REFERÊNCIAS

- AAPFCO, A. OF A. P. F. C. O. **Official Publication No. 50, T-29. Published by Association of American Plant Food Control Officials.** West Lafayette, Indiana, USA, 1995.
- ABOUL-FADL, T.; MOHAMMED, F. A. H.; HASSAN, E. A. S. Synthesis, antitubercular activity and pharmacokinetic studies of some Schiff bases derived from 1-alkylisatin and isonicotinic acid hydrazide (INH). **Archives of Pharmacal Research**, v. 26, n. 10, p. 778-784, 2003.
- AKIYAMA, H.; YAN, X.; YAGI, K. Evaluation of effectiveness of enhanced-efficiency fertilizers as mitigation options for N₂O and NO emissions from agricultural soils: Meta-analysis. **Global Change Biology**, v. 16, n. 6, p.1837-1846, 2010.
- ALCARDE, J. C.; GUIDOLIN, J. A.; LOPES, A. S. **Os adubos e a eficiência das adubações.** São Paulo: ANDA, 1989.
- ALI, S. M. M. *et al.* In vivo anticancer activity of Vanillin semicarbazone. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 6, p. 438-442, 2012.
- AMBERGER, A. Research on dicyandiamide as a nitrification inhibitor and future outlook. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 20, n. 19-20, p. 1933-1955, 1989.
- AMBUS, P.; ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S. Denitrification and N-cycling in forest ecosystems. In: **Biology of the nitrogen cycle.** Elsevier, 2007. p. 343-358.
- ANDA. **Consumo aparente de fertilizantes e matérias-primas em 2017.** Disponível em: <<http://brasil.ipni.net/article/BRS-3132>>. Acesso em: 18 dez. 2019.
- AQUINO, S. T. M. D.; SANTOS, R. F. D.; BATISTA, K. D. Nutritional deficiency symptoms of young 'cedro doce' plants grown under macronutrient omission. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 23, n. 4, p. 264-270, 2019.
- ARTOLA, E. *et al.* Effect of N-(n-butyl) thiophosphoric triamide on urea metabolism and the assimilation of ammonium by *Triticum aestivum* L. **Plant Growth Regulation**, v. 63, n. 1, p. 73-79, 2011.
- ASLAM, M. A. S. *et al.* Synthesis, biological assay in vitro and molecular docking studies of new Schiff base derivatives as potential urease inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 11, p. 5473-5479, 2011.
- BLENNERHASSETT, J. D. *et al.* The potential for increasing nitrogen responses using Agrotain treated urea. **Proceedings of the New Zealand Grassland Association**, v. 68, p. 297. 2006.
- BREMNER, J. M.; BREITENBECK, G. A.; BLACKMER, A. M. Effect of nitrapyrin on emission of nitrous oxide from soil fertilized with anhydrous ammonia. **Geophysical**

Research Letters, v. 8, n. 4, p. 353-356, 1981.

BRENTROP, F. *et al.* Application of the Life Cycle Assessment methodology to agricultural production: An example of sugar beet production with different forms of nitrogen fertilisers. **European Journal of Agronomy**, v. 14, n. 3, p. 221-233, 2001.

CABEZAS, W. A. R. L.; KORNDORFER, G. H.; MOTTA, S. A. Volatilização de N-NH₃ na cultura de milho: II. avaliação de fontes sólidas e fluidas em sistema de plantio direto e convencional. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 21, n. 3, p. 489-496, 1997.

CALABI-FLOODY, M. *et al.* Smart Fertilizers as a Strategy for Sustainable Agriculture. In: **Advances in Agronomy**. Academic Press, p. 119-157, 2018.

CAMERON, K. C.; DI, H. J.; MOIR, J. L. Nitrogen losses from the soil/plant system: A review. **Annals of Applied Biology**, v. 162, n. 2, p. 145–173, 2013.

CANTARELLA, H. *et al.* Stability of urease inhibitor added to urea. In: **Melbourne, Australia: 2016 International nitrogen initiative conference: solutions to improve nitrogen use efficiency for the world**. 2016.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F. [*et al.*]. **Fertilidade do solo**. 1^a ed. Viçosa, Minas Gerais: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, p. 375–470, 2007

CANTARELLA, H. *et al.* Agronomic efficiency of NBPT as a urease inhibitor: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 13, p. 19-27, 2018.

CHAVES-SILVA, S. *et al.* Do schiff bases-based urease inhibitors improve plant growth and affect the activity of soil arginase? **Industrial Crops and Products**, p. 111995, 2019.

CHEN, D. *et al.* Prospects of improving efficiency of fertiliser nitrogen in Australian agriculture: a review of enhanced efficiency fertilisers. **Soil Research**, v. 46, n. 4, p. 289-301, 2008.

CHOUDHARY, Muhammad Iqbal *et al.* **Schiff bases of thiazoles: a new class of ureases inhibitors**. U.S. Patent n. 9,447,057, 20 set. 2016.

CLAY, D. E.; MALZER, G. L.; ANDERSON, J. L. Division S-8. Fertilizer technology & use. Ammonia volatilization from urea as influenced by soil temperature, soil water content, and nitrification and hydrolysis inhibitors. **Soil Science Society of America Journal**, v. 54, n. 1, p. 263-266, 1990.

COELHO A. M., FRANÇA, G. E., BAHIA, A. F. C., GUEDES, G. A. A. Balanço De Nitrogênio (15N) Em Um Latossolo Vermelho-Escuro, Sob Vegetação De Cerrado, Cultivado Com Milho. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 15, p. 187–193, 1991.

DA SILVA, C. M. *et al.* **Schiff bases: A short review of their antimicrobial activities** **Journal of Advanced Research**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2011.

DE FÁTIMA, Â. *et al.* Schiff bases and their metal complexes as urease inhibitors—a brief review. **Journal of Advanced Research**, v. 13, p. 113-126, 2018.

DICK, W. A. Influence of long-term tillage and crop rotation combinations on soil enzyme activities. **Soil Science Society of America Journal**, v. 48, n. 3, p. 569-574, 1984.

DISE, N. B.; STEVENS, C. J. Nitrogen deposition and reduction of terrestrial biodiversity: evidence from temperate grasslands. **Science in China Series C: Life Sciences**, v. 48, n. 2, p. 720-728, 2005.

ENGEL, R. . *et al.* Apparent Persistence of N -(n -butyl) Thiophosphoric Triamide Is Greater in Alkaline Soils . **Soil Science Society of America Journal**, v. 77, n. 4, p. 1424-1429, 2013.

ERISMAN, J. W. *et al.* Reduced nitrogen in ecology and the environment. **Environmental Pollution**, v. 150, n. 1, p. 140-149, 2007.

WIEBE, K. How to feed the world in 2050. In: **Insights from an expert meeting at FAO**, p. 24-26., 2009.

FENN, L. B.; HOSSNER, L. R. Ammonia volatilization from ammonium or ammonium-forming nitrogen fertilizers. In: **Advances in Soil Science**. Springer, New York, NY, 1985. p. 123-169.

FRAZÃO, J. J. *et al.* Fertilizantes nitrogenados de eficiência aumentada e ureia na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi**, v. 18, n. 12, 2014.

GALLOWAY, J. N.; COWLING, E. B. Reactive nitrogen and the world: 200 years of change. **AMBIO: A Journal of the Human Environment**, v. 31, n. 2, p. 64-72, 2002.

HAWKESFORD, M. *et al.* Functions of Macronutrients. In: **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3^ªed. Academic Press, p. 135-189, 2012.

IFTIKHAR, F. *et al.* Design, synthesis, in vitro Evaluation and docking studies on dihydropyrimidine-based urease inhibitors. **Bioorganic Chemistry, Bioorganic Chemistry**, v. 74, p. 53-65, 2017.

ISHERWOOD, K. F. O uso de fertilizantes minerais e o meio ambiente. **International Fertilizer Industry Association, United Nations Environment Programme. Trad. Associação Nacional para Difusão de Adubos. Paris, 2000.**

KAISER, D. R. *et al.* **Nitrato na solução do solo e na água de fontes para consumo humano numa microbacia hidrográfica produtora de fumo.** 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

KALAIVANI, S.; PADMA PRIYA, N.; ARUNACHALAM, S. Schiff bases. Facile synthesis, spectral characterization and biocidal studies. **International Journal of**

Applied Biology and Pharmaceutical Technology, v. 3, p. 219-223, 2012.

KLUTHCOUSKI, J. *et al.* **Manejo antecipado do nitrogênio nas principais culturas anuais**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006.

KRAJEWSKA, B. **Ureases I**. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, n. 1-3, p. 9-21, 2009.

LOPES, A.S.; GUILHERME, L. R. G. **Uso Eficiente de Fertilizantes e Corretivos Agrícolas: Aspectos Agronômicos**. São Paulo, Associação Nacional para Difusão de Adubos, 2000. **Boletim Técnico**, n. 4, 2000.

LOPES, A. S. **Manual internacional de fertilidade do solo**. 2 ed. rev. ed. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1998.

GARSDALE M. **Forecasted total urea fertilizer demand worldwide from 2014 to 2023 (in million metric tons)**. Disponível em: <<https://www.statista.com/statistics/438995/total-demand-for-urea-fertilizer-worldwide-prediction/>>. Acesso em: 18 dez. 2019.

MA, B. L. *et al.* On-farm assessment of the amount and timing of nitrogen fertilizer on ammonia volatilization. **Agronomy Journal**, v. 102, n. 1, p. 134-144, 2010.

MANUNZA, B. *et al.* The binding mechanism of urea, hydroxamic acid and N-(N-butyl)-phosphoric triamide to the urease active site. A comparative molecular dynamics study. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, n. 5, p. 789-796, 1999.

MARKETWATCH. **N-(n-butyl) Thiophosphoric Triamide (NBPT) Market 2019 Industry Price Trend, Size Estimation, Industry Outlook, Business Growth, Report Latest Research, Business Analysis and Forecast 2024 Analysis Research**. Disponível em: <<https://www.marketwatch.com/press-release/n-n-butyl-thiophosphoric-triamide-nbpt-market-2019-industry-price-trend-size-estimation-industry-outlook-business-growth-report-latest-research-business-analysis-and-forecast-2024-analysis-research-2019-08-08>>. Acesso em: 21 dez. 2019.

MARTENS, D. A. Denitrification. In: **Encyclopedia of Soils in the Environment**. Elsevier, v. 1, p. 378–382., 2005.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Acordo de Paris. Disponível em: <https://www.mma.gov.br/clima/convencao-das-nacoes-unidas/acordo-de-paris>. Último acesso em: 10 de janeiro de 2020.

MODOLO, L. V. *et al.* **Pérolas de ureia combinadas com aldiminas, processo de obtenção e usos na agricultura, e aplicações das aldiminas no tratamento de infecções bacterianas**, WO/2016/174648, 03 de nov, 2016.

MOYO, C. C.; KISSEL, D. E.; CABRERA, M. L. Temperature effects on soil urease activity. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 21, n. 7, p. 935-938, 1989.

NEETESON, J. J.; CARTON, O. T. The environmental impact of nitrogen in field

vegetable production. **Acta Horticulturae**, 563. p. 21-28, 2001.

NOBEL PRIZE - All Nobel Prizes in Chemistry. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/lists/all-nobel-prizes-in-chemistry/>. Último acesso em: 10 de janeiro de 2020.

TRIVELIN, P. C. O. *et al.* Perdas do nitrogênio da uréia no sistema solo-planta em dois ciclos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 193-201, 2002.

OHYAMA, Takuji. Nitrogen as a major essential element of plants. *Nitrogen Assim. Plants*, 2010, 37: 1-17.

PANDEY, A. *et al.* Synthesis of Schiff bases of 2-amino-5-aryl-1, 3, 4-thiadiazole and its analgesic, anti-inflammatory and anti-bacterial activity. **Journal of Chemistry**, v. 9, n. 4, p. 2524-2531, 2012.

PINTO, V. M. *et al.* Uso excessivo de nitrogênio gera perda monetária para cafeicultores do cerrado baiano. **Coffee Science**, v. 12, n. 2, p. 176-186, 2017.

RAFIQ, M. *et al.* Facile synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of novel substituted azole derivatives. **Journal of Molecular Structure**, 2017, v. 1138, p. 177-191, 2017.

RAHIM, F. *et al.* Synthesis and antiurease & antioxidant activities of bis-Schiff bases of isophthalaldehyde. **Asian Journal of Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 39, 2016.

RAIJ, B. van. **Avaliação da fertilidade do solo**. Instituto Internacional da Potassa, Piracicaba, SP (Brasil), 1983.

RATHELOT, P. *et al.* Synthesis of novel functionalized 5-nitroisoquinolines and evaluation of in vitro antimalarial activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 30, n. 6, p. 503-508, 1995.

REHMAN, W. *et al.* Characteristic spectral studies and in vitro antifungal activity of some Schiff bases and their organotin (IV) complexes. **Chinese Science Bulletin**, v. 49, n. 2, p. 119-122, 2004.

REICHARDT, K.; LIBARDI, P. L.; URQUIAGA, S. C. Fate of fertilizer nitrogen in soil-plant systems with emphasis on the tropics. In: **International symposium on agrochemicals: fate in food and the environment**. p. 277-290, 1982.

ROCHETTE, P. *et al.* Banding of urea increased ammonia volatilization in a dry acidic soil. **J Journal of Environmental Quality**, v. 38, n. 4, p. 1383-1390, 2009.

ROTHSTEIN, Steven J. Returning to our roots: making plant biology research relevant to future challenges in agriculture. **The Plant Cell**, v. 19, n. 9, p. 2695-2699, 2007.

SAEED, A. *et al.* 2-(hetero(aryl)methylene)hydrazine-1-carbothioamides as potent

urease inhibitors. **Chemical biology & drug design**, v. 85, n. 2, p. 225-230, 2015.

SAN FRANCISCO, S. et al. Efficiency of urease and nitrification inhibitors in reducing ammonia volatilization from diverse nitrogen fertilizers applied to different soil types and wheat straw mulching. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 9, p. 1569-1575, 2011.

SANGOI, L. et al. Volatilização de N-NH₃ em decorrência da forma de aplicação de uréia, manejo de resíduos e tipo de solo, em laboratório. **Ciência Rural**, v. 33, n. 4, p. 687-692, 2003.

SEMOKA, J. Nitrogen Cycle. In: CHESWORTH, W. **Encyclopedia of soil science**. Springer Science & Business Media. p. 902, 2008.

SENGIK, E. et al. Perdas de amônia em solo e de resíduos orgânicos autoclavados e tratados com uréia. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 23, p. 1099–1105, 2001.

SMIL, V. Global Population and the Nitrogen Cycle. **Scientific American**, v. 277, n. 1, p. 76–81, 1997.

SMILL, V. **Enriching the earth: Fritz Haber, Carl Bosch, and the transformation of world food production**. Cambridge, Massachusetts, London, England: The MIT Press, 2001.

SMITH, S.J., SCHEPERS, J.S., PORTER, L. K. Assessing and managing agricultural nitrogen losses to the environment. In: **Advances in soil science**. Springer, New York, NY, p. 1-43, 1990.

SOARES, J. R.; CANTARELLA, H.; DE CAMPOS MENEGALE, M. L. Ammonia volatilization losses from surface-applied urea with urease and nitrification inhibitors. **Soil biology and biochemistry**, v. 52, p. 82-89, 2012.

SOMMER, S. G.; SCHJOERRING, J. K.; DENMEAD, O. T. Ammonia Emission from Mineral Fertilizers and Fertilized Crops. **Advances in agronomy**, v. 82, n. 557622, p. 82008-4, 2004.

SUBBARAO, G. et al. Scope and strategies for regulation of nitrification in agricultural systems—challenges and opportunities. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 25, n. 4, p. 303-335, 2006.

TAIZ, L. et al. Nutrição Mineral. In: **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6^a ed. Artmed Editora, p. 119–142, 2017.

TASCA, F. A. et al. Volatilização De Amônia do solo após a aplicação de ureia convencional ou com inibidor de urease. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, n. 2, p. 493-502, 2011

TRENKEL, M. E. **Controlled-release and stabilized fertilizers in agriculture**. Paris: International fertilizer industry association, 1997.

TRENKEL, M. E. **Slow-and controlled-release and stabilized fertilizers: An option for enhancing nutrient use efficiency in agriculture**. IFA, International fertilizer industry association, 2010.

UPADHYAY, L. S. B. Urease inhibitors. A Review. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 34, n. 2, p. 145-55., 2012.

VIERO, F. *et al.* Ammonia volatilization from nitrogen fertilizers in no-till wheat and maize in southern Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 5, p. 1515-1525, 2014.

VITTI, A. C. *et al.* Produtividade da cana-de-açúcar relacionada à localização de adubos nitrogenados aplicados sobre os resíduos culturais em canavial sem queima. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 31, n. 3, p. 491-498, 2007.

VITTI, G. C. *et al.* Influência da mistura de sulfato de amônio com uréia sobre a volatilização de nitrogênio amoniacal. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, n. 3, p. 663-671, 2002.

WATSON, C. J. *et al.* Rate and mode of application of the urease inhibitor N-(n-butyl) thiophosphoric triamide on ammonia volatilization from surface-applied urea. **Soil Use and Management**, v. 24, n. 3, p. 246–253, 2008.

WATSON, C. J. *et al.* Urease activity and inhibition-principles and practice. In: **Proceedings-International Fertiliser Society**. International Fertiliser Society, 2000. p. 1-40.

YADAV, M. R. *et al.* Strategies for improving nitrogen use efficiency: A review. **Agricultural Reviews**, v. 38, n. 1, p. 29-40, 2017.

YAMADA, T.; ABDALLA, S. R. S. Como melhorar a eficiência da adubação nitrogenada do milho?. **Informações Agronômicas**. POTAFOS. Piracicaba-SP, Brasil. n. 91, 2000.

ZAMAN, M. *et al.* Effects of urease and nitrification inhibitors on the efficient use of urea for pastoral systems. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 59, n. 4, p. 649-659, 2013.

ZANIN, L. *et al.* The urease inhibitor NBPT negatively affects DUR3-mediated uptake and assimilation of urea in maize roots. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 1007, 2015.

ZAVASCHI, E. **Volatilização de amônia e produtividade do milho em função da aplicação de ureia revestida com polímeros**. 2010. Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo. São Paulo. 2010.