

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Núbia Rangel Cândido

**EXTRATO PIROLENHOSO: caracterização, identificação dos
componentes principais e efeitos sobre a atividade ureolítica de urease**

Belo Horizonte

2023

Núbia Rangel Cândido

**EXTRATO PIROLENHOSO: caracterização, identificação dos
componentes principais e efeitos sobre a atividade ureolítica de urease**

Tese apresentada ao Departamento de Química
do Instituto de Ciências Exatas da Universidade
Federal de Minas Gerais, como requisito parcial
à obtenção do título de Doutor em Ciências -
Química

Orientador: Ângelo de Fátima

Coorientadora: Vânia M. D. Pasa

Belo Horizonte

2023

Ficha Catalográfica

C651e
2023
T Cândia, Núbria Rangel.
Extrato pirolenhoso [manuscrito] : caracterização, identificação dos componentes principais e efeitos sobre a atividade ureolítica de urease / Núbria Rangel Cândia. 2023. 135 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Ângelo de Fátima.
Coorientadora: Vânia Márcia Duarte Pasa.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Química.
Bibliografia: f. 101-121.
Apêndices: f. 122-135.

1. Físico-química – Teses. 2. Análise de componentes principais – Teses. 3. Urease – Teses. 4. Inibidores enzimáticos – Teses. 5. Carvão vegetal – Indústria – Subprodutos – Teses. 6. Cromatografia de gás – Teses. 7. Espectrometria de massa – Teses. 8. Cromatografia líquida de alta eficiência – Teses. I. Fátima, Ângelo de, Orientador. II. Pasa, Vânia Márcia Duarte, Coorientadora. III. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



"Extrato Pirolenhoso: Caracterização, Identificação dos Componentes Principais e Efeitos sobre a Atividade Ureolítica de Urease"

Núbia Rangel Cândido

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Ângelo de Fátima - Orientador
UFMG

Profa. Vânia Márcia Duarte Pasa - Coorientadora
UFMG

Profa. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira
UFC

Prof. Sergio Antonio Fernandes
UFV

Profa. Lucienir Pains Duarte
UFMG

Prof. Fabiano Vargas Pereira
UFMG

Belo Horizonte, 30 de agosto de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Fabiano Vargas Pereira, Professor do Magistério Superior**, em 31/08/2023, às 10:29, 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 **Angelo de Fatima, Professor do Magistério Superior**, em 03/09/2023, às 11:59, 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 **Lucienir Pains Duarte, Professora do Magistério Superior**, em 03/09/2023, às 17:34, 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 **Maria da Conceição Ferreira de Oliveira, Usuária Externa**, em 05/09/2023, às 11:10, 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 **Sérgio Antônio Fernandes, Usuário Externo**, em 16/10/2023, às 07:14, 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 **Vanya Marcia Duarte Pasa, Professora do Magistério Superior**, em 17/10/2023, às 12:05, 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 **2580750** e o código CRC **0D3E7995**.

Ao meu pequeno Luiz

AGRADECIMENTOS

A Deus, que em sua infinita misericórdia e graça me capacitou e sustentou, à minha família, pelo apoio incondicional, aos meus orientadores Professores Ângelo e Vânia pelos direcionamentos e instruções, à Prof. Luzia por ter sido mais que uma colaboradora, aos meus colegas da pós-graduação, em especial Breno, Carol, Nat e Luciana, ao Professor Thiago Mendonça de Aquino da UFAL pelas análises, à Rima Industrial S/A, à EPB Extrato Pirolenhoso do Brasil e às agências de fomento FAPEMIG, CNPq e Capes pelo suporte e ao Departamento de Química da UFMG e seus funcionários pela estrutura que me permitiu desenvolver este trabalho.

RESUMO

O aumento da produção de alimentos para atender à demanda da crescente população mundial é em grande parte condicionado pela eficiência dos fertilizantes. O desenvolvimento de inibidores de urease de custo relativamente baixo e mais ecológicos é um desafio para o setor. O extrato pirolenhoso (EP), um subproduto da indústria de carvoejamento, tem se mostrado um aliado às práticas agrícolas, por proporcionar benefícios às plantas e ao solo. Embora muitos de seus efeitos sejam reportados, os compostos e mecanismos envolvidos ainda são pouco conhecidos, devido, principalmente, à complexidade da constituição química do EP. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo caracterizar e avaliar o potencial uso do EP como inibidor da urease. Foram caracterizadas e avaliadas quatro amostras de EP obtidas a partir da carbonização de diferentes biomassas (eucalipto, acácia negra e casca de coco) e em processos produtivos distintos (fornos de alvenaria e fornos metálicos). Os resultados *in vitro* de inibição da urease de *Canavalia ensiformis* (Jack Bean) mostraram que os EPs apresentaram atividades inibitórias diferentes, que variaram com a biomassa e com o processo produtivo. O EP de eucalipto produzido em forno metálico (1.EPCE) foi o que apresentou maior atividade, seguido do EP de casca de coco (3.EPCC) também produzido em forno metálico e, por fim, os de acácia negra (4.EPAN) e eucalipto (2.EPAE) produzidos em fornos de alvenaria. O 1.EPCE foi submetido à extração sequencial com diferentes solventes para facilitar a identificação dos principais compostos envolvidos na inibição da urease. Dentre os compostos avaliados, o 4-metilcatecol (MC) e pirocatecol (PC) apresentaram a maior atividade anti-ureolítica e o docking molecular foi realizado para esclarecer a atividade inibitória destes compostos. Os dois EPs de eucalipto (forno metálico e forno de alvenaria), assim como os PC e MC, também foram avaliados quanto à capacidade de inibir a volatilização da amônia emitida pela ureia no solo em sistema fechado com fluxo de ar contínuo. O 1.EPCE teve desempenho semelhante ao NBPT, o mais bem-sucedido inibidor da urease do mercado, não apresentando diferença estatisticamente significativa para a porcentagem de N acumulado perdido. Os resultados mostram-se promissores quanto à inibição da urease pelas amostras de EP, principalmente devido ao seu baixo custo, biodegradabilidade, não toxicidade, elevada solubilidade em água e efeitos benéficos ao desenvolvimento das plantas.

Palavras chaves: vinagre de madeira; extrato pirolenhoso; urease; inibidor de urease; bioestimulante.

ABSTRACT

The increase in food production to meet the growing global population's demand is largely dependent on the efficiency of fertilizers. Developing low-cost and more environmentally friendly urease inhibitors is a challenge for the agricultural sector. Pyroligneous acid (PA), a by-product of the charcoal industry, has proven to be an ally to agricultural practices by providing benefits to both plants and soil. While many of its effects have been reported, the compounds and mechanisms involved are still relatively unknown, primarily due to the complex chemical composition of PA. Therefore, this study aimed to characterize and evaluate the potential use of PA as a urease inhibitor. Four samples of PA obtained from the carbonization of different biomass sources (eucalyptus, black wattle, and coconut husk) and in different production processes (metal kilns and brick ovens) were characterized and evaluated. In vitro results of urease inhibition in *Canavalia ensiformis* (Jack Bean) showed that the PAs exhibited varying inhibitory activities, which depended on the biomass source and production process. The eucalyptus PA produced in a metal kiln (1.EPCE) exhibited the highest activity, followed by the coconut husk PA (3.EPCC), also produced in a metal kiln, and finally, the black wattle (4.EPAN) and eucalyptus (2.EPAE) PAs produced in brick ovens. The 1.EPCE underwent sequential extraction with different solvents to facilitate the identification of the main compounds involved in urease inhibition. Among the evaluated compounds, 4-methylcatechol (MC) and pyrocatechol (PC) showed the greatest urease inhibition, and molecular docking was performed to elucidate the inhibitory activity of these compounds. Both eucalyptus PAs (metal kiln and brick oven) as well as PC and MC were also evaluated for their ability to inhibit the ammonia volatilization emitted by urea in the soil in a closed system with continuous airflow. The 1.EPCE performed similarly to NBPT, the most successful urease inhibitor in the market, with no statistically significant difference in the percentage of accumulated nitrogen lost. The results appear promising regarding urease inhibition by the PA samples, primarily due to their low cost, biodegradability, non-toxicity, high water solubility, and beneficial effects on plant development.

Keywords: wood vinegar; pyroligneous acid; urease; urease inhibitor; biostimulant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular dos três álcoois precursores da lignina: o álcool <i>p</i> -cumarílico, coniferílico e sinapílico.	21
Figura 2. Mudança temporal da concentração de formaldeído em diferentes temperaturas de amostragem do vinagre de madeira (YATAGAI, 2013)	26
Figura 3. Compostos com efeito promotor e inibidor da germinação presentes nas soluções de fumaça (LIGHT <i>et al.</i> , 2010).....	36
Figura 4: Proporção de consumo mundial de fertilizantes nitrogenados por tipo (IFASTAT, 2017).....	47
Figura 5: Mecanismo de inibição da urease proposto para o pirocatecol (MAZZEI, Luca <i>et al.</i> , 2017a).....	51
Figura 6: Esquema do sistema para avaliação da inibição da urease no solo.....	64
Figura 7: Representação esquemática para substância húmica pirolítica proposta por Stankovikj <i>et al.</i> (2017).	71
Figura 8: Comparação dos perfis cromatográficos de CG-EM das amostras de extrato pirolenhoso extraídas com MTBE. Condições cromatográficas: Coluna analítica NA-WAX (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm), Programa de temperatura: 2 minutos a 60 °C, rampa de 5 °C/min, e estabilização a 220 °C por 16 minutos. Injetor em modo split 1:10, a 250 °C. Gás de arraste: Hélio (0,7 mL min ⁻¹).....	73
Figura 9: Cromatogramas de CG-EM com a identificação dos principais picos das amostras de EP extraídas com MTBE: a) de Eucalipto produzido no Forno Container b) de Casca de Coco produzido no Forno Metálico Piloto. Condições cromatográficas: Coluna analítica NA-WAX (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm), Programa de temperatura: 2 minutos a 60 °C, rampa de 5 °C/min, e estabilização a 220 °C por 16 minutos. Injetor em modo split 1:10, a 250 °C. Gás de arraste: Hélio (0,7 mL min ⁻¹).....	75
Figura 10: Cromatogramas de CG-EM com a identificação dos principais picos das amostras de EP extraídas com MTBE: a) de Eucalipto produzido no Forno de alvenaria b) de Acácia Negra produzido no Forno de alvenaria. Condições cromatográficas: Coluna analítica NA-WAX (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm), Programa de temperatura: 2 minutos a 60 °C, rampa de 5	

°C/min, e estabilização a 220 °C por 16 minutos. Injetor em modo split 1:10, a 250 °C. Gás de arraste: Hélio (0,7 mL min ⁻¹).	76
Figura 11: Comparação dos principais grupos de substâncias presentes nas amostras de extrato pirolenhoso propostas através das análises de GC-EM.	77
Figura 12: Gráfico de concentração dos extratos pirolenhosos <i>versus</i> efeito inibitório <i>in vitro</i> da atividade da urease de <i>Canavalia ensiformis</i> (Jack Bean).	84
Figura 13: Curvas de inibição da urease <i>versus</i> dosagem dos extratos pirolenhosos.	85
Figura 14. Correlação entre o índice de refração (°Brix) e a concentração mínima necessária das amostras de extrato pirolenhoso para inibir 50% da atividade enzimática da urease de <i>Canavalia ensiformis</i> (IC ₅₀).	88
Figura 15: Concentração mínima necessária da amostra de extrato pirolenhoso de eucalipto produzido em forno metálico (1.EPCE) e de suas frações extraídas com os seis solvente: hexano, tolueno, clorofórmio, diclorometano, MTBE, butanol para inibir 50% da atividade enzimática da urease de <i>Canavalia ensiformis</i> (IC ₅₀).	89
Figura 16: Arranjo espacial após encaixe do 02 (bege) e 25 (ciano) no sítio alostérico da urease (A). Interações de 02 (B) e 25 (C) com resíduos da urease.	93
Figura 17: Gráficos RMSD para os átomos do esqueleto Cα da urease livre (linha preta) e em complexo com PC (linha vermelha) e MC (linha verde).	93
Figura 18: (A) Razão entre nitrogênio volatilizado e nitrogênio aplicado de ureia isolada, ureia + NBPT, ureia + pirocatecol (PC), ureia + 4-metilcatecol (MC); ureia + extrato de EPBE e ureia + extrato de EPCE. (B) Perda acumulada de nitrogênio ao longo do tempo de ureia não tratada, ureia tratada com NBPT ou com pirocatecol (PC), ou 4-metilcatecol (MC), ou extrato de EPBE, ou extrato de EPCE. * Indica um ponto no tratamento EPCE onde não foi possível medir amônia volatilizada.	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração média em mg mL ⁻¹ dos componentes majoritários do extrato pirolenhoso de Eucalipto (<i>Eucalyptus camaldulensis</i>), leguminosa (<i>Leucaena leucocephala</i>), árvore de Neem (<i>Azadirachta indica</i>), seringueira (<i>Hevea brasiliensis</i>), bambu (<i>Dendrocalamus asper</i>) e duas amostras comerciais (Super Guard e Tanami) (THEAPPARAT, Y. <i>et al.</i> , 2015a).	24
Tabela 2. Faixa de concentração de alguns compostos presentes no extrato pirolenhoso de diferentes biomassas (YATAGAI, 2013).	26
Tabela 3. Proporção média dos componentes majoritários do extrato pirolenhoso destilado (HIGASHINO; SHIBATA; YATAGAI, 2005) e bruto.	28
Tabela 4: Especificação para controle de qualidade do extrato pirolenhoso do Sistema de Certificação de Vinagre de Madeira e Bambu do Japão.	29
Tabela 5. Normas regulatórias para o uso do EP na agricultura e indústria de alimentos adotadas em diferentes países.	31
Tabela 6. Efeitos na produtividade promovidos pela aplicação do extrato pirolenhoso na agricultura.	32
Tabela 7. Condições e efeitos da aplicação do extrato pirolenhoso na germinação de algumas culturas de interesse agrícola.	38
Tabela 8. Identificação das amostras analisadas	54
Tabela 9. Quantidades dos compostos utilizada em cada poço de reação da microplaca.	62
Tabela 10. Caracterização físico-química das amostras de extrato pirolenhoso.	67
Tabela 11. Alguns compostos identificados nas análises cromatográficas, com seus respectivos tempos de retenção, área absoluta em cada amostra e atividade/propriedade reportada na literatura.	78
Tabela 12. Concentração mínima dos extratos pirolenhosos de eucalipto (1.EPCE e 2.EPAE)*, casca de coco (3.EPCC)* ou acácia negra (4.EPAN)* para inibir 50% da atividade (IC ₅₀) da urease de <i>Canavalia ensiformis</i> (Jack Bean).	85

Tabela 13: Valores de IC₅₀ de compostos identificados nas análises de CG-EM das frações extraídas da amostra de extrato pirolenhoso 1.EPCE e outros compostos com estruturas semelhantes que apresentaram atividade anti-ureolítica. 91

Tabela 14: Média e desvio padrão da média da razão entre nitrogênio volatilizado e nitrogênio aplicado e percentual de N perdido da ureia isolada, ureia + NBPT, ureia + pirocatecol (PC), ureia + 4-metilcatecol (MC); ureia + extrato de 2.EPAE e ureia + extrato de 1.EPCE. 97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 1.EPCE: Extrato Pirolenhoso de Eucalipto produzido no Forno Container;
 - 2.EPAE: Extrato Pirolenhoso de Eucalipto produzido em forno de alvenaria;
 - 3.EPCC Extrato Pirolenhoso de Casca de Coco produzido em forno metálico;
 - 4.EPAN: Extrato Pirolenhoso de Acácia Negra produzido em forno de alvenaria.
- AH: Ácido húmico
AF: Ácido fúlvico
C_{org}: Teor de carbono orgânico
EHT: Extrato húmico total
EP: Extrato Pirolenhoso
CG-EM: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CG-IC: A Cromatografia Gasosa acoplada ao detector por Ionização de Chama
HCl: Ácido clorídrico
HPA: Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IARC: Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MC: 4-metil-pirocatecol
MTBE: Éter metil-terc-butílico
NBPT: *N*-(*n*-butil) tiofosfórico triamida
OSQ: Derivado da oxidação do pirocatecol
PC: Pirocatecol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	COMPOSIÇÃO E ESTABILIDADE	20
2.2	REGULAMENTAÇÃO PARA USO DO EXTRATO PIROLENHOSO	28
2.3	EFEITO DO EXTRATO PIROLENHOSO NA PRODUTIVIDADE DE CULTURAS AGRÍCOLAS	32
2.4	EFEITO DO EXTRATO PIROLENHOSO NA GERMINAÇÃO	34
2.5	EFEITO BACTERICIDA E FUNGICIDA DO EXTRATO PIROLENHOSO	39
2.6	EFEITO REPELENTE	40
2.7	EFEITO DO EXTRATO PIROLENHOSO NO SOLO	40
2.8	REMOÇÃO E REDUÇÃO DA MOBILIDADE DE METAIS PESADOS	42
2.9	EFEITO BIOESTIMULANTE	44
2.9.1	AMINOÁCIDOS	45
2.9.2	ÁCIDOS ORGÂNICOS	45
2.9.3	ÁCIDOS HÚMICOS E FÚLVICOS	46
2.10	EXTRATO PIROLENHOSO NA INIBIÇÃO DA UREASE	47
2.11	MECANISMOS DE AÇÃO DOS INIBIDORES DE UREASE CONHECIDOS	50
3	OBJETIVOS.....	53
3.1	OBJETIVO GERAL	53
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
4	METODOLOGIA.....	54
4.1	AMOSTRAS	54
4.2	CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO PIROLENHOSO	55
4.2.1	MACRO E MICRONUTRIENTE	55
4.2.2	TEOR DE CARBONO ORGÂNICO	56
4.2.3	pH, CONDUTIVIDADE ELÉTRICA, DENSIDADE, ÍNDICE DE REFRAÇÃO (°Brix) E ACIDEZ	56
4.2.4	TEOR DE ÁCIDOS HÚMICOS E FÚLVICOS	57
4.2.5	TEOR DE FENÓIS	58
4.2.6	TEOR DE AÇÚCARES	58
4.2.7	QUANTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDO POR CLAE	59
4.2.8	CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)	59
4.2.8.1	QUANTIFICAÇÃO DE HPAS	59
4.2.8.2	EXTRAÇÃO COM ÉTER METIL-TERC-BUTÍLICO (MTBE)	60

4.2.8.3	EXTRAÇÃO SEQUENCIAL COM DIFERENTES SOLVENTES	60
4.3	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO PIROLENHOSO NA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA UREASE <i>IN VITRO</i>	61
4.4	MODELAGEM MOLECULAR DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS INIBIDORES IDENTIFICADOS NO EP	62
4.5	AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA UREASE EM SISTEMA FECHADO COM FLUXO DE AR CONTÍNUO	63
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5.1	CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS	66
5.1.1	AMINOÁCIDOS	69
5.1.2	ÁCIDOS HÚMICOS E FÚLVICOS	70
5.2	PRINCIPAIS COMPOSTOS EXTRAÍDOS COM MTBE IDENTIFICADOS POR CROMATOGRAFIA	72
5.3	INIBIÇÃO DA UREASE <i>IN VITRO</i> DAS AMOSTRAS	84
5.4	INIBIÇÃO DA UREASE <i>IN VITRO</i> DAS FRAÇÕES	88
5.5	DOCKING MOLECULAR E DINÂMICA	92
5.6	INIBIÇÃO DA UREASE EM SISTEMA FECHADO COM FLUXO DE AR CONTÍNUO	93
6	CONCLUSÕES	99
	REFERÊNCIAS	101
	APÊNDICE A - RESULTADOS DAS ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	122
	APÊNDICE B - PRODUÇÃO CIENTÍFICA ORIUNDA DESTA TESE	134

1 INTRODUÇÃO

A expectativa de crescimento da população mundial para 8,5 bilhões de pessoas em 2030, apresenta-se como um desafio para o setor agrícola, uma vez que se projeta uma necessidade de expansão da produção de alimentos em 35%, para o mesmo período (EMBRAPA, 2018). Nesse contexto, o Brasil terá um papel de protagonista, como um dos principais países produtores e exportadores deste setor. Estima-se que 87% do crescimento esperado para a produção agrícola global venha de melhorias no rendimento e eficácia da capacidade produtiva de alimentos (UNITED NATIONS, 2015). Dessa forma, a busca por estratégias que aumentem o rendimento e a rentabilidade do produtor, ao passo que também fortaleçam a sustentabilidade do meio rural, são primordiais para que alcancemos as metas estabelecidas.

Dentre os insumos agrícolas de grande impacto na produtividade encontram-se os fertilizantes. No Brasil, o uso desses produtos para adubação aumentou em 87%, entre 2000 e 2015, contribuindo para o significativo crescimento da produção de grãos de 150%, experimentado no mesmo período (EMBRAPA, 2018). Entretanto, a produção nacional de fertilizantes é historicamente muito inferior à demanda interna. Estima-se que, em 2020, mais de 80% desses insumos utilizados no Brasil foram importados (BRASIL, 2021), o que vem, ao longo dos anos, reforçando a dependência das importações. Um fator agravante está associado ao não aproveitamento integral dos fertilizantes aplicados, decorrente de perdas por lixiviação, volatilização, entre outras.

Os fertilizantes nitrogenados são os mais consumidos no mundo, sendo que mais de 50% desta classe é aplicada sob a forma de ureia. Ao ser aplicada ao solo, a ureia sofre hidrólise, resultando na formação de dois gases (amônia e dióxido de carbono) e água. Na presença da enzima urease, essa reação é cerca de 10^{14} vezes mais rápida (MODOLO *et al.*, 2018). Por isso, grande parte do nitrogênio aplicado não é efetivamente aproveitada pela planta, sendo perdida, principalmente, pela volatilização da amônia. Uma forma de evitar essas perdas é por meio da inibição da enzima urease. Outros métodos incluem, por exemplo, a associação da aplicação da ureia com períodos de chuva ou irrigação, promovendo o movimento da ureia para camadas mais profundas do solo. Entretanto, não são tão efetivos. Uma alternativa possível será

apresentada nesse trabalho, envolvendo um coproduto da atividade de carvoejamento, denominado extrato pirolenhoso (EP).

O Brasil é o maior produtor de carvão vegetal do mundo, com uma produção de 6,4 milhões de toneladas em 2019, que visa abastecer, principalmente, a indústria Siderúrgica Brasileira (FAOSTAT, 2020). Durante a conversão térmica da madeira, apenas 25-35% da biomassa é convertida em carvão vegetal, enquanto a proporção restante é transformada em coprodutos, como o extrato pirolenhoso (EP), o alcatrão vegetal (ou bio-óleo) e os gases não condensáveis (CGEE, 2015; THEAPPARAT, Y.; CHANDUMPAI; FAROONGSARNG, 2018). Embora apresentem elevado potencial de aplicação, na maior parte da produção brasileira de carvão vegetal, esses coprodutos não são recuperados, uma vez que seu mercado ainda é pouco desenvolvido no Brasil.

O EP consiste em uma solução aquosa com aproximadamente 80 a 90% de água e mais de 200 compostos orgânicos derivados da decomposição térmica da celulose, hemicelulose e lignina, sendo muitos desses compostos substâncias biologicamente ativas (GREWAL; ABBEY; GUNUPURU, 2018). Devido a sua rica composição, o EP apresenta diversas aplicações, principalmente na agricultura (CÂNDIDO *et al.*, 2023; GREWAL; ABBEY; GUNUPURU, 2018), indústria alimentícia (LINGBECK *et al.*, 2014; ROZUM, 2014) e nutrição animal (CHU *et al.*, 2013; KOOK; JEONG; KIM, 2005; SAKAIDA; ENYA; TANAKA, 1987; SAMANYA, M AND YAMAUCHI, 2001; WATARAI; TANA, 2005; YAMAUCHI; RUTTANAVUT; TAKENOYAMA, 2010).

Na indústria alimentícia, onde é conhecido como fumaça líquida, o EP é responsável por promover o sabor e o aroma de defumado aos alimentos, além de funcionar como corante e conservante natural, devido às propriedades antimicrobianas e antioxidantes (LINGBECK *et al.*, 2014)

O uso do EP como aditivo na nutrição animal também tem sido estudado há vários anos. Os trabalhos relatam que este produto ajuda a recuperar a integridade e a saúde intestinal, reduzindo as bactérias patogênicas (WATARAI; TANA, 2005), promovendo o desenvolvimento das vilosidades intestinais (YAMAUCHI; RUTTANAVUT; TAKENOYAMA, 2010) e aumentando a disponibilidade e a absorção dos nutrientes (CHOI *et al.*, 2009; RATTANAWUT; TODSADEE; YAMAUCHI, 2017), o que resulta em um maior ganho de peso e em uma maior qualidade da carne e dos ovos (YAMAUCHI; MATSUMOTO; YAMAUCHI, 2016). O amplo uso de antibióticos na criação animal tem causado preocupação

em relação à segurança alimentar e a suplementação das dietas dos animais com extrato pirolenhoso tem se mostrado uma alternativa natural promissora para redução do uso de antibióticos (QU *et al.*, 2018; WANG, H. F. *et al.*, 2012). Além disso, estudos mostram o potencial de aplicação do EP na redução do mau odor na suinocultura e na redução dos gases de efeito estufa ao ser aplicado tanto na dieta quanto sobre os dejetos animais (XIN *et al.*, 2021).

Apesar da utilização do EP na Indústria Alimentícia e na Nutrição Animal, a sua principal aplicação está na Agricultura. O EP é utilizado na China e no Japão a centenas de anos e seu uso foi liberado para Agricultura Orgânica pelo Ministério da Agricultura do Japão desde 2001 (CAMPOS, 2018a). Diversos estudos sobre a utilização do EP na agricultura relatam efeitos benéficos no crescimento (MAHMUD *et al.*, 2016), na produtividade (BENZON; LEE, 2016), na indução de resistência (JAMIL *et al.*, 2014; WANG, Y. *et al.*, 2019), no enraizamento (MAHMUD *et al.*, 2016), no desenvolvimento da microbiota benéfica do solo (STEINER *et al.*, 2008), na repelência de insetos (HAGNER, M.; TIILIKKALA; *et al.*, 2020; KIARIE-MAKARA; YOON; LEE, 2010), na germinação das sementes (DISSATIAN *et al.*, 2018; JÄGER; RABE; VAN STADEN, 1996) e na compostagem (WANG, Quan *et al.*, 2018). Entretanto, os mecanismos e os compostos bioativos responsáveis por cada propriedade ainda são pouco conhecidos, tendo em vista a grande diversidade de componentes presentes no extrato. Alguns dos efeitos do EP parecem estar envolvidos com o aumento da absorção de nitrogênio, aumento do teor de clorofila e das taxas fotossintéticas (AREMU *et al.*, 2012; GREWAL; ABBEY; GUNUPURU, 2018; JAMIL *et al.*, 2014).

A utilização do EP como inibidor da urease pode contribuir consideravelmente para o desenvolvimento da produção agrícola brasileira, promovendo um maior aproveitamento dos fertilizantes nitrogenados e um melhor desenvolvimento das culturas. Poucos trabalhos da literatura avaliaram a atividade da urease após a aplicação do EP e alguns resultados são controversos.

A composição do EP está atrelada a diversos parâmetros de produção que foram descritos na circular técnica 178 da Embrapa Clima Temperado, com destaque para o tipo do forno e biomassa utilizada. Esses parâmetros podem resultar em diferentes respostas na inibição da urease e diferentes efeitos na planta como um todo. A completa caracterização do EP é um desafio, em função dos mais de 200 compostos orgânicos presentes de diferentes classes (ácidos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, éteres, fenóis, açúcares) (STAŠ *et al.*, 2014).

O EP de eucalipto produzido em fornos de alvenaria é o tipo de EP de maior oferta no Brasil. O eucalipto corresponde a 76,9% de toda a área estimada de florestas plantadas no país (dados de 2021) (IBGE, 2021) e os fornos de alvenaria são os mais utilizados para produção de carvão vegetal (CGEE, 2015). Nesses fornos a carbonização (pirólise lenta) dura em média três a quatro dias. A acácia negra é uma outra espécie de madeira dura com cultivo comercial, utilizada na produção de carvão vegetal, principalmente, no sul do Brasil, embora em escala muito inferior ao eucalipto. O carvão de acácia negra é destinado, em sua maioria, ao consumo residencial em churrasqueiras. De acordo com a Embrapa, estimasse que a casca de coco corresponde a cerca de 70% de todo lixo gerado nas praias brasileiras (EMBRAPA, 2004). Um dos destinos para esse resíduo é a produção de carvão vegetal para briquete e carvão ativado. Em geral, a carbonização da casca de coco se dá em fornos metálicos, de forma mais rápida (30 horas), em relação aos fornos de alvenaria.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho é caracterizar quatro extratos pirolenhos produzidos a partir de diferentes biomassas e processos, avaliar seus efeitos sobre a atividade da enzima urease e investigar os possíveis compostos presentes nos extratos responsáveis pela atividade anti-ureolítica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Composição e estabilidade

O extrato pirolenhoso (EP), também conhecido como vinagre de madeira e fumaça líquida, é um produto orgânico produzido por meio da condensação de parte dos gases gerados na pirólise da biomassa. Durante este processo, ocorre a decomposição térmica da celulose, hemicelulose e lignina dando origem ao carvão vegetal (26-35%), ao extrato pirolenhoso (30-34%), ao alcatrão vegetal (13-15%) e aos gases não condensáveis (21-23%) (CGEE, 2015). O extrato pirolenhoso tem caráter ácido e é composto por centenas de moléculas bioativas em solução aquosa que conferem ao produto propriedades antibióticas (SOUZA *et al.*, 2018), fungicidas (GAO *et al.*, 2020), desodorantes (SHIBUTANI *et al.*, 2014), estimulantes do crescimento vegetal (MAHMUD *et al.*, 2016), dentre outras.

O EP apresenta em sua composição entre 80-90% de água, sendo os 10-20% restantes correspondentes aos mais de 200 compostos orgânicos diversos que incluem ácidos, fenóis, cetonas, aldeídos, álcoois, açúcares, entre outros (STAŠ *et al.*, 2014; THEAPPARAT, Y. *et al.*, 2015a). O ácido acético é o composto presente no EP em maior concentração, depois da água, correspondendo a aproximadamente 3-7% do produto. A composição do extrato pirolenhoso depende do tipo de biomassa, do processo de pirólise empregado, das condições operacionais e formas de armazenamento. A variedade de compostos presentes no EP é proveniente da decomposição térmica da celulose, hemicelulose e lignina, que são os principais constituintes da biomassa (STAŠ *et al.*, 2014).

A celulose é constituída por monômeros de glicose unidas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$ glicosídicas e corresponde ao principal componente presente na biomassa lignocelulósica (40-50% m/m de madeira seca). Os polímeros de celulose são agrupados em microfibrilas por meio de ligações de hidrogênio com as moléculas adjacentes. As microfibrilas de celulose formam um arcabouço que é preenchido por moléculas de hemicelulose, ligninas, pectina e glicoproteínas. As hemiceluloses constituem de 25-35% da biomassa lignocelulósica em base seca e desempenham um papel importante na expansão da parede celular por travar as microfibrilas de celulose, onde se ligam através de ligações de hidrogênio, enquanto a lignina é responsável por fornecer resistência à compressão e rigidez à parede celular (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

A principal diferença entre a hemicelulose e a celulose deve-se ao fato de que as hemiceluloses apresentam várias unidades de açúcares diferentes (glicose, galactose, manose, xilose, arabinose e ácido glucurônico), com cinco ou seis átomos de carbono, que podem ser lineares ou ramificadas. Suas unidades monoméricas são unidas por ligações do tipo 1,3; 1,4 e 1,6 e o comprimento das cadeias é de aproximadamente 150 unidades, muito inferior ao da celulose (5000-10000 unidades) (MOHAN; PITTMAN; STEELE, 2006).

Por outro lado, a estrutura heterogênea da lignina consiste em uma rede de anéis aromáticos com grandes quantidades de ligações cruzadas entre eles, constituída pela polimerização de três álcoois precursores, os álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Figura 1), que dão origem às unidades fenilpropanóides, denominadas *p*-hidroxifenila (H), guaiacila (G), siringila (S), respectivamente. Estas unidades encontram-se distribuídas em diferentes proporções nos grupos vegetais (PONNUSAMY *et al.*, 2019).

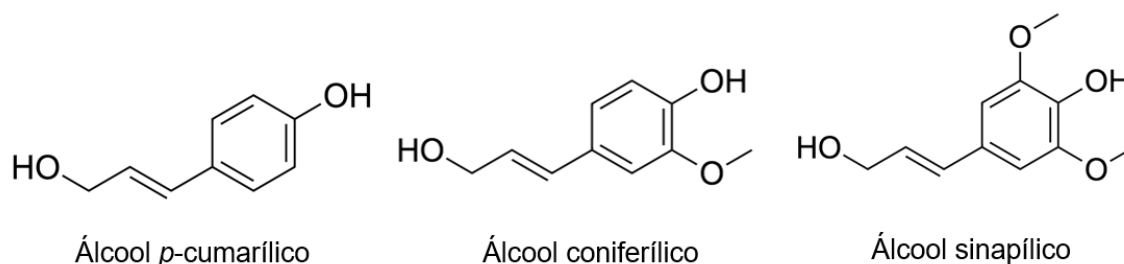


Figura 1. Estrutura molecular dos três álcoois precursores da lignina: o álcool *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico.

Em madeiras moles (coníferas), como o pinus, predomina a lignina do tipo guaiacila, produzida pela polimerização do álcool coniferílico. Em madeiras duras (angiospermas), como o Eucalipto, encontra-se tipicamente a lignina guaiacila-siringila, que consiste em um copolímero dos álcoois sinapílico e coniferílico. Enquanto em gramíneas, como a cana-de-açúcar, e também na casca de coco, a lignina comumente encontrada é do tipo siringila-guaiacila-*p*-cumarila, formada a partir dos álcoois sinapílico, coniferílico e *p*-hidroxicumarílico (FENGEL; WEGENER, 2011; RENCORET *et al.*, 2013). A lignina representa um dos maiores estoques de carbono e energia da natureza e é o maior depósito de estruturas químicas aromáticas, constituindo-se em uma fonte potencial de valiosos insumos para a indústria química (CORREIA *et al.*, 2011).

A anidro-hexose levoglucosan encontrada no extrato pirolenhoso é o principal produto da pirólise da celulose. Além deste, a pirólise da celulose também resulta na formação de outros compostos como açúcares, furanos (furfural, hidroximetilfurfural), cetonas cíclicas (3-metil-1,2-ciclopentanodiona, 2-hidroxi-2-ciclopenten-1-ona) e produtos menores como o glicolaldeído, acetol e o ácido acético (PECHA; GARCIA-PEREZ, 2015; WANG, ZHOUGHONG, 2013).

Alguns compostos como ácido acético, ácido fórmico, acetol e furfural estão associados à pirólise da hemicelulose (PATWARDHAN; BROWN; SHANKS, 2011). Enquanto, os compostos fenólicos são provenientes basicamente da degradação térmica da lignina, devido às unidades fenilpropano precursoras de sua estrutura. Além desses, também estão presentes diferentes tipos de dímeros e oligômeros de lignina que não são facilmente identificados, devido à baixa volatilidade ou ausência de dados espectrais conhecidos (WANG, S. et al., 2011). Essa grande complexidade de compostos presentes no extrato pirolenhoso dificulta sua completa caracterização.

Staš *et al.* (2014) publicaram uma revisão sobre os diferentes métodos analíticos comumente usados na caracterização química dos produtos líquidos da pirólise. Os métodos revisados consistiam, principalmente, em métodos cromatográficos e espectrométricos. A Cromatografia Gasosa acoplada ao detector por Espectrometria de Massas (CG-EM) ou acoplada ao detector por Ionização de Chama (CG-IC) é muito utilizada. No entanto, essas técnicas geralmente permitem a identificação de não mais do que 50% dos compostos presentes no EP, devido a coeluição, resolução cromatográfica insuficiente, indisponibilidade de espectros nas bibliotecas e a não-volatilidade de alguns compostos (STAŠ *et al.*, 2014).

Pimenta *et al.* (2018) identificaram por CG-EM noventa e três compostos presentes no extrato pirolenhoso de eucalipto através da extração com diclorometano, éter dietílico e acetato de etila. Anteriormente à extração, a amostra foi neutralizada com a adição de hidróxido de amônio, com o intuito de diminuir a concentração de ácido acético extraído na fase orgânica e para aumentar a força iônica da solução, tornando os compostos orgânicos menos solúveis na fase aquosa e melhorando a eficiência da extração líquido-líquido. Os compostos fenólicos constituíam o principal grupo identificado nas frações, seguidos pelos aldeídos e cetonas, furanos, piranos e ésteres (PIMENTA *et al.*, 2018).

Silva *et al.* (2019) identificaram cento e trinta e seis compostos orgânicos presentes na fração aquosa da pirólise lenta de sementes de crame por cromatografia gasosa bidimensional

abrangente acoplada à espectrometria de massa por tempo de voo. A amostra foi submetida ao processo de liofilização anterior a análise e a fração liofilizada correspondeu a 14,3% da massa inicial. Os compostos identificados foram agrupados em classes, sendo 20,4% correspondente aos ácidos carboxílicos, 19,3% às amidas, 15,3% aos álcoois, 6,58% às cetonas, 3,06% aos açúcares, entre outros (SILVA *et al.*, 2019).

R. Li *et al.* (2018) analisaram amostras de dois extratos pirolenhosos de madeira dura, três de madeira macia e um de bambu, além de algumas amostras destiladas, e quantificaram 25 tipos de compostos fenólicos. A concentração total desses compostos nas amostras analisadas variou de 1140,7 a 3322,6 mg L⁻¹, sendo a amostra de bambu a que apresentou maior concentração. Fenol, 2-metoxifenol, 2-metoxi-4-metilfenol, 2-metoxi-4-etilfenol foram relativamente abundantes em todas as amostras analisadas. Para os extratos não destilados, o fenol foi encontrado em maiores concentrações no extrato de bambu (932,12 mg L⁻¹), enquanto nos extratos de madeira dura e mole sua concentração variou entre 178,16 e 254,94 mg L⁻¹ e 192,65 a 236,80 mg L⁻¹, respectivamente. O 4-etil-2-metoxifenol apresentou uma concentração média semelhante em todas as amostras não destiladas variando de 159,19 a 160,07 mg L⁻¹. Enquanto, o siringol (2,6-dimetoxifenol) foi encontrado em concentrações mais elevadas nas amostras não destiladas de madeira dura (131,57 a 321 mg L⁻¹) e bambu (632,76 mg L⁻¹), mas em baixas concentrações nos extratos não destilados de madeira mole (21,53 a 46,80 mg L⁻¹). Isso ocorreu porque a lignina de madeira dura contém principalmente unidades guaiacila-siringila, enquanto a lignina de madeira mole é composta principalmente por unidades guaiacila, conforme explicitado anteriormente (LI, R. *et al.*, 2018).

Theapparatt *et al.* (2015) quantificaram os principais componentes de cinco amostra de EP provenientes da carbonização das biomassas de Eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis*), da leguminosa *Leucaena leucocephala*, da árvore de Neem (*Azadirachta indica*), da seringueira (*Hevea brasiliensis*) e do bambu (*Dendrocalamus asper*) obtidas de uma carvoaria na província de Nakhon Rachasima, na Tailândia, além de duas amostras comerciais (Super Guard e Tanami). Os compostos quantificados por Theapparatt, Y. *et al.* (2015a) estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração média em mg mL⁻¹ dos componentes majoritários do extrato pirolenhoso de Eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis*), leguminosa (*Leucaena leucocephala*), árvore de Neem (*Azadirachta indica*), seringueira (*Hevea brasiliensis*), bambu (*Dendrocalamus asper*) e duas amostras comerciais (Super Guard e Tanami) (THEAPPARAT, Y. *et al.*, 2015a).

Compostos	Eucalipto	Leguminosa	Árvore de Neem	Seringueira	Bambu	Comercial 1	Comercial 2
Ácido acético	40,26 ± 2,02	37,38 ± 0,04	32,49 ± 0,08	69,34 ± 0,17	70,6 ± 0,20	39,48 ± 0,016	30,45 ± 0,45
Metanol	3,92 ± 0,04	3,85 ± 0,66	6,13 ± 0,14	4,43 ± 0,09	4,52 ± 0,05	3,90 ± 0,04	0,69 ± 0,04
Propanol	ND	ND	0,02 ± 0,00	ND	ND	ND	ND
Σ Derivados de álcool	3,92	3,85	6,15	4,43	4,52	3,9	0,69
2-Furfuraldeído	0,45 ± 0,00	0,60 ± 0,02	5,23 ± 0,01	2,69 ± 0,03	0,67 ± 0,01	6,51 ± 0,05	0,09 ± 0,00
2-furoato de metila	0,18 ± 0,01	0,08 ± 0,00	0,87 ± 0,01	0,62 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,49 ± 0,03	0,02 ± 0,00
2-Metilfurano	0,23 ± 0,01	0,27 ± 0,00	0,34 ± 0,00	0,79 ± 0,02	0,55 ± 0,03	0,39 ± 0,02	0,16 ± 0,00
Σ Furfural e derivados de furano	0,86	0,95	6,44	4,1	1,35	7,39	0,27
Fenol	0,94 ± 0,01	0,75 ± 0,01	1,01 ± 0,01	0,67 ± 0,01	0,46 ± 0,02	0,80 ± 0,01	0,91 ± 0,01
2-Metilfenol (o-cresol)	3,82 ± 0,02	2,76 ± 0,01	3,17 ± 0,01	2,16 ± 0,11	4,06 ± 0,06	2,26 ± 0,02	3,43 ± 0,02
3-Metilfenol (m-cresol)	1,67 ± 0,01	0,68 ± 0,00	1,28 ± 0,05	0,05 ± 0,00	0,32 ± 0,00	ND	ND
4-Metilfenol (p-cresol)	0,11 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,16 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,01 ± 0,00
2-Etilfenol	0,03 ± 0,00	ND	0,03 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,00	ND
2,6-Dimetilfenol	ND	ND	0,05 ± 0,00	0,42 ± 0,00	ND	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00
2,5-Dimetilfenol	0,29 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,24 ± 0,00	0,20 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,46 ± 0,02	0,06 ± 0,00
2,4-Dimetilfenol	ND	ND	ND	ND	ND	0,41 ± 0,02	0,08 ± 0,00
2,3-Dimetilfenol	0,06 ± 0,00	ND	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,00	ND	0,02 ± 0,00	ND
Σ Derivados de fenol	6,92	4,43	5,98	3,7	5,03	4,12	4,52
4-Propil-2-metoxifenol	6,90 ± 0,05	5,88 ± 0,03	5,54 ± 0,02	11,56 ± 0,04	9,56 ± 0,01	7,29 ± 0,20	8,12 ± 0,01
4-Metil-2-metoxifenol	1,51 ± 0,01	0,24 ± 0,00	1,27 ± 0,01	2,59 ± 0,06	2,23 ± 0,01	1,12 ± 0,04	1,18 ± 0,01
4-Etil-2-metoxifenol	1,46 ± 0,02	0,20 ± 0,01	1,34 ± 0,02	2,81 ± 0,02	2,33 ± 0,01	1,40 ± 0,02	0,82 ± 0,01
Guaiacol	0,40 ± 0,00	0,66 ± 0,01	0,36 ± 0,01	1,33 ± 0,04	4,28 ± 0,02	0,38 ± 0,01	0,24 ± 0,01
Eugenol	0,27 ± 0,01	ND	0,21 ± 0,01	5,23 ± 0,02	2,16 ± 0,02	1,99 ± 0,01	1,38 ± 0,01
Siringol	1,20 ± 0,02	0,93 ± 0,01	3,88 ± 0,01	3,57 ± 0,02	0,06 ± 0,00	2,01 ± 0,01	0,79 ± 0,00
Acetovanilona	ND	ND	ND	0,18 ± 0,01	ND	ND	ND
Σ Derivados de metoxifenol	11,74	7,91	12,6	27,27	20,62	14,19	12,53
Σ Concentrações totais de fenol	18,66	12,34	18,58	30,97	25,65	18,31	17,05
1,2 Di-hidroxibenzeno	ND	ND	ND	0,18 ± 0,01	ND	ND	0,08 ± 0,00
Σ Total	63,7	54,52	63,66	108,84	102,12	69,08	48,46

Além da complexidade inerente ao grande número de componentes, essa variedade de compostos químicos também é responsável por conferir instabilidade ao extrato pirolenhoso. Os compostos orgânicos presentes no extrato pirolenhoso podem reagir entre si durante o armazenamento, principalmente nos primeiros meses após sua produção. Algumas das reações comuns levam a formação de ésteres, devido à reatividade entre álcoois e ácidos orgânicos. Outras, provenientes da reatividade entre aldeídos ou entre aldeídos e fenóis, levam a formação de oligômeros e resinas, compostos que possuem uma maior densidade e baixa solubilidade em água (DIEBOLD, 1999).

As reações de esterificação no extrato pirolenhoso são favoráveis e podem ocorrer levando a formação de água e dos ésteres acetato de metila, propanoato de metila e formiato de metila (ou metanoato de metila), a partir da reação do metanol com os ácidos acético, propanoico e fórmico, respectivamente. O meio ácido do extrato pirolenhoso pode proporcionar a protonação do átomo de oxigênio do grupo carbonila, tornado o ácido carboxílico muito mais reativo ao ataque nucleofílico do álcool.

Alguns dos compostos presentes no extrato pirolenhoso, como formaldeído, metanol e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), podem ser tóxicos dependendo da concentração, por isso, diversos estudos foram realizados pela Associação de Vinagre de Madeira e Bambu do Japão de forma a garantir que se as recomendações de produção forem atendidas, os compostos considerados tóxicos estejam dentro de limites aceitáveis. As concentrações para esses compostos reportadas no *handbook* japonês escrito por Yatagai (2013) variaram de 1.800-9.400 mg L⁻¹ para o metanol, 68-730 mg L⁻¹ para o formaldeído e 0,1-0,2 ppb para o 3,4-benzopireno (Tabela 2). O formaldeído, por exemplo, tem seu teor reduzido, principalmente nos primeiros meses após a produção (Figura 2), devido a reações de polimerização com os fenóis, evidenciando a importância do período de decantação de três a seis meses normalmente sugerido na literatura (YATAGAI, 2013), que deve anteceder o uso do extrato nas diversas aplicações.

Tabela 2. Faixa de concentração de alguns compostos presentes no extrato pirolenhoso de diferentes biomassas (YATAGAI, 2013).

Compostos	Faixa
Metanol (mg L ⁻¹)	1.800-9.400
Formaldeído (mg L ⁻¹)	68-730
Ácido fórmico (mg L ⁻¹)	220-340
Fenóis (m/v %)	0,1-0,7
Acidez (m/v %)	1-8,4
3,4-benzopireno (ppb)	ND-0,2

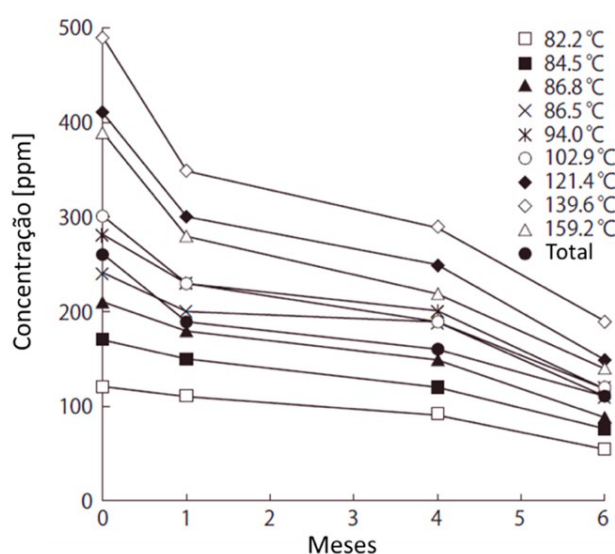


Figura 2. Mudança temporal da concentração de formaldeído em diferentes temperaturas de amostragem do vinagre de madeira (YATAGAI, 2013)

Principalmente para a aplicação do extrato pirolenhoso na agricultura, indústria alimentícia e em nutrição animal é essencial o controle dos HPAs que são considerados cancerígenos pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC). A Portaria nº 52, de 15 de Março de 2021 – Anexo VIII exige que os HPAs no EP estejam abaixo de 0,7 µg L⁻¹ para aplicação na Agricultura Orgânica. Com base nos limites de segurança estabelecidos pelos órgãos internacionais para alimentos, a Embrapa recomenda o limite de 0,34 mg L⁻¹ para a soma de 4 HPAs (benzo[a]pireno, criseno, benz[a]antraceno e benzo[b]fluoranteno) e de 0,49 mg L⁻¹ para a soma de 8 HPAs (benzo[a]pireno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[g,h,i]perileno, criseno, dibenzo[a,h] antraceno, e indeno[1,2,3-cd]pireno) (CAMPOS, 2018a).

Os HPAs constituem uma grande classe de compostos orgânicos com dois ou mais anéis aromáticos ligados. A maioria são sólidos incolores, brancos ou amarelos. Os HPAs são produzidos tanto por fontes antropológicas (queima de combustíveis fósseis, processos industriais e culinários), quanto naturais (formado por plantas, algas, microrganismos, fitoplâncton ou vulcões), sendo sua principal geração devida à combustão incompleta de qualquer material à base de carbono. Embora exista mais de 400 tipos de HPAs, a maioria das regulamentações focam em 16 contaminantes prioritários com base em suas possíveis exposições humanas, toxicidade, frequência de ocorrência em locais de resíduos perigosos e extensão das informações disponíveis (MOJIRI *et al.*, 2019).

Muitas vezes os HPAs são associados ao alcatrão, uma vez que a formação de ambos é favorecida em altas temperaturas durante a carbonização. Entretanto, não necessariamente a presença de alcatrão significa um teor de HPA alto. O alcatrão pode se formar por reações de polimerização e condensação entre alguns compostos comuns do extrato pirolenhoso mesmo a temperatura ambiente. Mun e Ku (2010) criaram uma mistura modelo para simular o extrato pirolenhoso com seus principais componentes (ácido acético 3,0%; ácido propiônico 0,4%; ácido fórmico 0,2%; metanol 0,4%; fenol 0,3%; *o*-, *m*-, *p*-cresóis 0,1% cada e siringol 0,1%) e observaram que após um ano, armazenado a temperatura ambiente, formou-se na mistura modelo uma resina semelhante ao alcatrão (MUN e KU, 2010).

A expressão "alcatrão solúvel" é utilizada na literatura para se referir a compostos presentes em amostras de EP que reagem entre si para produzir alcatrão (uma mistura de hidrocarbonetos oxigenados e resinas de solubilidade em água muito limitada). No entanto, Othmer propõe que uma expressão mais apropriada seria "materiais formadores de alcatrão solúveis", uma vez que eles não estão na forma de alcatrão (OTHMER; KATZEN, 1943).

Além da decantação, o processo de destilação, algumas vezes, tem sido recomendado para remoção dos compostos formadores de alcatrão, entretanto, no processo de destilação também ocorrem perdas de compostos de interesse, podendo comprometer a eficiência do extrato nas suas mais diversas aplicações. Conforme mostrado por Li Z. *et al.* (2018), alguns dos compostos com capacidade antioxidante presentes no extrato pirolenhoso, como a 3-metil-1,2-ciclopentanodiona e o 2,6-dimetoxifenol não são completamente destilados, sendo que a maior parte permanece no fundo do balão da destilação, sendo perdida neste processo. Ao comparar a atividade antioxidante do EP bruto em relação ao EP destilado, os autores

mostraram uma redução significativa da capacidade antioxidante após a destilação (LI, Z. et al., 2018).

Higashino *et al.* (2005) analisaram 551 amostras de extratos pirolenhosos destilados de madeira mole, determinaram as proporções médias para 15 dos componentes majoritários (excluindo a água) e compararam com os teores médios presentes no extrato pirolenhoso bruto (Tabela 3). Observa-se uma redução na proporção de diversos compostos e uma maior concentração de ácido acético após a destilação. Os resultados apresentados confirmam a perda de compostos de interesse durante o processo de destilação (HIGASHINO; SHIBATA; YATAGAI, 2005).

Tabela 3. Proporção média dos componentes majoritários do extrato pirolenhoso destilado (HIGASHINO; SHIBATA; YATAGAI, 2005) e bruto.

Principais compostos	EP destilado (%)	EP bruto (%)
Ácido acético	55,18	34,80
Hidroxiacetona	12,05	5,09
Ácido propanoico	5,80	7,29
Guaiacol	6,21	2,27
Butirolactona	3,79	2,87
2-ciclopentenona+furfural	3,12	6,45
Fenol	2,92	2,89
Cresol	2,30	3,00
Hidroxi-2-butanona	2,26	4,82
Cicloteno	2,07	3,51
Ácido butírico	1,35	6,30
<i>p</i> -Cresol	1,21	6,74
Acetoxi-2-propanona	0,76	7,61
<i>o</i> -Cresol	0,65	4,96
Etil-guaiacol	0,32	1,42

2.2 Regulamentação para uso do extrato pirolenhoso

No Japão, o extrato pirolenhoso tem seu uso liberado na agricultura orgânica e é reconhecido como "material fertilizante e de melhoramento do solo" nas Normas Agrícolas Japonesas para Produtos Agrícolas Orgânicos, desde 2000 (Ministério da Agricultura, Silvicultura e Notificação de Pesca do Japão nº 59 em 20 de janeiro de 2000). O controle de qualidade desse produto é realizado pela Associação de Vinagre de Madeira do Japão e estima-se que cerca de 4.000 toneladas de extrato pirolenhoso de madeira e bambu sejam produzidas no Japão por ano (JAPAN WOOD VINEGAR ASSOCIATION, 2020). Fundada em 1º de abril de 1989, a Associação lançou em fevereiro de 2005 o "Sistema de Certificação de Vinagre de

Madeira e Bambu Líquido", cujo escopo de aplicação é limitado ao seu uso como material agrícola (incluindo desodorantes e repelentes para animais pequenos).

O sistema de certificação japonês realiza o monitoramento da qualidade uma vez por ano e examina o sistema de fabricação das empresas certificadas. O produto deve atender a especificação apresentada na Tabela 4. Além disso, i) a temperatura da chaminé para coleta do extrato pirolenhoso durante sua produção deve estar entre 80 °C e 150 °C; ii) a madeira utilizada deve ser conhecida, livre de pesticidas, de substâncias de tratamento e de resinas como nos compensados de madeira; iii) os extratos devem ser armazenados em recipientes opacos e resistentes a ácidos e iv) o produto deve decantar por pelo menos 90 dias antes do uso.

Tabela 4: Especificação para controle de qualidade do extrato pirolenhoso do Sistema de Certificação de Vinagre de Madeira e Bambu do Japão.

Parâmetros	Vinagre de madeira e bambu bruto	Vinagre de madeira e bambu destilado
pH	1,5 a 3,7	
Gravidade específica	1,005 ou mais	1,001 ou mais
Acidez	2 a 12 (%)	
Transparência	Amarelo a castanho avermelhado claro (sem flutuação)	Incolor a amarelo claro a marrom claro avermelhado claro (sem flutuação)

De acordo com a Associação o pH é determinado por fitas de papel ou pHmetro, a gravidade específica por meio de um densímetro padrão (entre 15 °C e 25 °C), a acidez por titulação com NaOH assumindo que todo ácido presente é ácido acético, enquanto a coloração e transparência são determinadas por análise visual.

No Brasil, o EP tem seu uso autorizado na Agricultura convencional como agente quelante, complexante orgânico e aditivo estabilizante para produção de fertilizantes orgânicos e organominerais de acordo com a Instrução Normativa N° 25, de 23 de Julho de 2009 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e para Agricultura Orgânica como substância autorizada para manejo, controle de pragas e doenças nos vegetais e tratamento pós-colheita, de acordo com a Portaria n° 52, de 15 de Março de 2021 – Anexo VIII. As normas Japonesas e as especificações da Associação de Vinagre de Madeira e Bambu do Japão têm servido de base para criação da regulamentação do extrato pirolenhoso no Brasil que tiveram início com as circulares técnicas da Embrapa (CAMPOS, 2018a, b, 2007). A Tabela 5 apresenta

as normas regulatórias para o uso de EP na agricultura e na indústria de alimentos adotadas por alguns países.

Tabela 5. Normas regulatórias para o uso do EP na agricultura e indústria de alimentos adotadas em diferentes países.

País	Autoridade	Norma	Categoria (listada como)	Uso autorizado
Brasil	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento	Instrução Normativa nº 25, de 23 de Julho de 2009	Extrato Pirolenhoso	Agente complexante orgânico e aditivo estabilizador para a produção de fertilizantes orgânicos e organominerais
Brasil	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento	Instrução Normativa nº 61 de 8 de Julho de 2020 – Anexo II	Extrato Pirolenhoso	Aditivos autorizados para uso em fertilizantes orgânicos e biofertilizantes
Brasil	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento	Portaria nº 52, de 15 de Março de 2021 – Anexo VIII	Extrato Pirolenhoso	Substância autorizada para manejo, controle de pragas e doenças nos vegetais e tratamento pós-colheita nos sistemas Orgânicos de Produção
China	Administração de Certificação e Acreditação da República Popular da China	Norma Nacional da República Popular da China	Ácido natural (por exemplo, vinagre, vinagre de madeira, vinagre de bambu)	Bactericida na agricultura orgânica
China	Comitê Nacional de Saúde e Planejamento Familiar da China (substituído pela Comissão Nacional de Saúde da República Popular da China)	Norma Nacional de Segurança Alimentar para Uso de Aditivos Alimentares (GB2760-2014)	Ácido Pirolenhoso	Aditivo alimentar (substâncias aromatizantes naturais permitidas em alimentos com o código N267)
China	Comitê Nacional de Saúde e Planejamento Familiar da China (substituído pela Comissão Nacional de Saúde da República Popular da China)	Norma Nacional de Segurança Alimentar para Uso de Aditivos Alimentares (GB2760-2014)	Extrato de ácido Pirolenhoso	Aditivo alimentar (substâncias aromatizantes não naturais que podem ser utilizadas em alimentos com o código S0850)
Japão	Ministério da Agricultura, Silvicultura e Pesca	Padrões agrícolas japoneses para produtos agrícolas orgânicos (notificação nº 59 em 20 de janeiro de 2000). Revisão completa: Notificação No.1605 de 27 de outubro de 2005	Outros fertilizantes e substâncias para melhorar o solo	Fertilizantes e agente de melhoramento do solo
Tailândia	Departamento Nacional de Commodities Agrícolas e Normas Alimentares Ministério da Agricultura e Cooperativas	Norma Agrícola Tailandês (TAS 9000-2009)	Vinagre de madeira	Controle de pragas e doenças de plantas (ainda a ser totalmente certificado pelas autoridades competentes)

2.3 Efeito do Extrato Pirolenhoso na produtividade de culturas agrícolas

Diversos estudos já foram conduzidos e publicados reportando os benefícios do EP na agricultura. Dentre as vantagens de sua aplicação, uma das mais comuns é o aumento na produtividade. Tal efeito tem sido normalmente associado a maior absorção de nutrientes pelas plantas, resultando em um maior crescimento e produção, o que pode ser ilustrado nos resultados reportados na Tabela 6.

Tabela 6. Efeitos na produtividade promovidos pela aplicação do extrato pirolenhoso na agricultura.

Cultura	País	Melhor concentração	Frequência de aplicação	Aumento na produção	Referência
Alface	China	0,2%	A cada 10 dias	20,2%	(JUN <i>et al.</i> , 2006)
Pepino	China	0,2%	A cada 10 dias	18,2%	(JUN <i>et al.</i> , 2006)
Couve	China	0,2%	A cada 10 dias	20,1%	(JUN <i>et al.</i> , 2006)
Arroz	Filipinas	1%	Quinzenalmente	68%	(ROGELIO, 2018)
Arroz	Tailândia	0,33%	No tratamento da semente e foliar a cada duas semanas	8,6%	(JOTHITYANGKOON; WANAPAT; POLTHANEE, 2012)
Soja	Tailândia	0,5%	Semanalmente	10%	(PANGNAKORN <i>et al.</i> , 2009)
Mirtilo	China	0,2%	4 aplicações mensais no solo	18,4%	(ZHANG, Yuchan <i>et al.</i> , 2020)

Os experimentos realizados por Mungkunkamchao *et al.* (2013) no cultivo do tomate, mostraram que as aplicações do EP por pulverização foliar ou encharcamento do solo forneceram respostas semelhantes, independentes da forma de aplicação. A aplicação de EP, seja ela foliar ou por gotejamento no solo, resultou em plantas com n° e peso (fresco e seco) dos frutos estatisticamente iguais a aplicação de NPK (dose alta) e rendeu frutos 19 e 30% mais pesados em relação as plantas gotejadas ou pulverizadas apenas com água. A aplicação de EP, isoladamente ou em combinação com os extratos fermentados, foi capaz de substituir parcialmente o uso de fertilizante químico (NPK na dose recomendada), especialmente durante os estágios iniciais de crescimento nos experimentos em campo (MUNGKUNKAMCHAO *et al.*, 2013).

De 1995 a 1996 foram realizados três experimentos na fazenda experimental da Universidade Miyazaki no Japão, onde foram avaliados os efeitos da mistura de carvão com EP (mistura que recebeu o nome de Sennekka E) no crescimento da parte aérea e da raiz da batata-doce. Os autores reportaram um aumento na absorção de nitrogênio, na taxa fotossintética e no peso da matéria seca tanto da parte aérea quanto subterrânea. O tratamento promoveu um aumento da taxa fotossintética, através do aumento da área foliar e do teor de clorofila, que resultou em um maior crescimento da cultura (DU *et al.*, 1998).

Aumentos nos rendimentos também foram reportados por Jun *et al.* (2006) no cultivo de vegetais em Pequim, onde foram avaliadas as diluições 0,125% (1:800); 0,2% (1:500); 0,33% (1:300) com pulverizações a cada 10 dias durante o período de crescimento. Tanto a alface, quanto a couve e o pepino responderam positivamente as aplicações e apresentaram os melhores resultados nas aplicações com diluição de 1:500, onde foram reportados aumentos nos rendimentos de aproximadamente 20% para as três culturas. O EP também promoveu um aumento na Vitamina C da alface em 35% (JUN *et al.*, 2006).

Estudos da aplicação do EP na cultura do arroz têm reportado aumentos no enraizamento, no crescimento e na produtividade. Tsuzuki *et al.* (2000) reportaram aumentos no enraizamento com a aplicação do EP e de alguns de seus componentes separados dentre eles, 4-etilfenol (0,01 g L⁻¹), vanilina, guaiacol, *m*-cresol e *o*-cresol (TSUZUKI; MORIMITSU; MATSUI, 2000).

Um trabalho realizado nas Filipinas em julho de 2017, na cultura de arroz irrigada, relatou um aumento expressivo de 68% na produção e um aumento de 104% no retorno do investimento para aplicação do EP a cada duas semanas na diluição de 1:100. Os autores ainda reportaram a redução de incidência de pragas e doenças (ROGELIO, 2018).

Jothityangkoon *et al.* (2012) reportaram os resultados obtidos por cinco agricultores da Tailândia com a aplicação do EP no tratamento da semente de arroz juntamente com a aplicação foliar a cada duas semanas durante toda a estação de crescimento. Os experimentos foram realizados durante a estação seca de janeiro a abril de 2010. As sementes de arroz foram embebidas em EP (1:300) por 48 horas antes da semeadura. Avaliações realizadas na colheita mostraram que o tratamento com EP aumentou significativamente o peso da parte aérea, o comprimento e área superficial das raízes e a produtividade de panículas e sementes. A produtividade média de sementes aumentou de 2675 kg ha⁻¹ para 2906 kg ha⁻¹ (JOTHITYANGKOON; WANAPAT; POLTHANEE, 2012).

Além do aumento na produtividade (peso/área plantada), diversos estudos também têm reportado um aumento no teor de açúcar. Entre 1990 e 1995, foram realizados cinco experimentos em três localidades para avaliação do efeito da mistura do EP com carvão no teor de açúcar de uma variedade de melão. O aumento do teor de açúcar promovido pelo tratamento foi associado pelos autores ao aumento da atividade da sacarose fosfato sintase (SPS) (DU *et al.*, 1998). No mesmo período, o aumento do conteúdo de açúcar pela aplicação da mistura do EP com carvão também foi avaliado na cultura de cana-de-açúcar. A aplicação de 4 ton ha⁻¹ da mistura (EP:carvão 1:4) resultou em um aumento de 21-44% no rendimento em açúcar (ton ha⁻¹) da cultura e ainda promoveu um aumento de 6-12% no nº de colmos, de 12% na altura dos colmos e de 10-46% na matéria seca total (UDDIN *et al.*, 1994).

Outro trabalho realizado com melões na Malásia também reportou o aumento da doçura dos frutos com a aplicação de EP associado a um fertilizante local comumente utilizado pelos agricultores da região (ZULKARAMI *et al.*, 2011). O tratamento também promoveu um maior crescimento das plantas, peso e diâmetro dos frutos. Dois experimentos de campo realizados em 2010 no Japão com batata doce mostraram o aumento do teor de açúcar e da qualidade visual da batata-doce com a aplicação do EP (DOU; KOMATSUZAKI; NAKAGAWA, 2012). Pan *et al.* (2016) reportaram aumentos de 5,27% a 10,28% no teor de açúcar, de 3,46% a 17,15% no conteúdo de vitamina C e de 10,53% a 11,52% no rendimento de tomates cultivados com a aplicação do EP (PAN *et al.*, 2016).

2.4 Efeito do extrato pirolenhoso na germinação

A germinação das sementes e o estabelecimento das plântulas são etapas muito delicadas do ciclo de vida vegetal. As sementes percebem sinais ambientais específicos que induzem a síntese de fitormônios, envolvidos na iniciação do crescimento, por meio da ativação ou inativação de enzimas e reações metabólicas diversas. Dentre os principais fatores externos que afetam a germinação, pode-se destacar a luz, a água, a temperatura e o oxigênio, sendo que a influência de cada um desses fatores pode variar de espécie para espécie. Algumas sementes, por exemplo, germinam apenas após extensa exposição à luz, outras com curta exposição, enquanto algumas germinam apenas no escuro ou ainda são indiferentes a luminosidade.

O tratamento de sementes é uma técnica cada vez mais empregada nas lavouras, seja para uniformizar e reduzir o tempo de emergência, aumentar o vigor das plântulas e a tolerância

a condições de estresse ou reduzir a ação de patógenos. Com esse intuito, diversos estudos têm avaliado o efeito do EP na germinação das sementes.

É conhecido que a fumaça e os extratos de fumaça provenientes da combustão de materiais vegetais estimulam a germinação e o crescimento pós-germinativo de muitas espécies, principalmente de plantas de ambientes propensos ao fogo, devido a características evolutivas. O interesse pela ação da fumaça derivada de plantas na germinação ganhou proporção na década de 90, após a publicação de De Lange e Boucher (1990) ao demonstrarem que a germinação de sementes de *Audouinia capitata* era iniciada por fatores químicos encontrados na fumaça (DE LANGE; BOUCHER, 1990). Na busca por identificar quais eram os compostos bioativos responsáveis por esses efeitos promotores presentes na fumaça, pesquisadores da Austrália e da África do Sul identificaram, em 2004, o 3-metil-2*H*-furo[2,3-*c*]piran-2-ona (KAR1), derivado da combustão da celulose (FLEMATTI *et al.*, 2004; VAN STADEN *et al.*, 2004). Posteriormente, vários análogos ao KAR1 foram encontrados (KAR2-KAR6: Figura 3), todos contendo um anel butenolídeo de cinco membros e um anel pirano de seis membros, variando entre si principalmente pela posição dos grupos metila (FLEMATTI *et al.*, 2009).

Outro composto denominado hidroquinona (Figura 3) também foi isolado de fumaças por Kamran *et al.* (2017) ao demonstrar, em baixas concentrações (5, 10 ppm), efeito promotor da germinação e do crescimento da parte aérea e do hipocótilo das plântulas de alface. Em contraste, a concentração de 100 ppm do composto tem efeito contrário, inibindo a germinação (KAMRAN *et al.*, 2017).

Da mesma forma que alguns compostos presentes na fumaça apresentaram efeitos promotores da germinação, outros demonstraram efeitos inibitórios, como, por exemplo, o 3,4,5-trimetilfuran-2(5*H*)-ona, o 5,5-dimetilfuran-2(5*H*)-ona e o 5-etilfuran-2(5*H*)-ona (Figura 3) (BURGER *et al.*, 2018; LIGHT *et al.*, 2010). Curiosamente, tanto os KARs (estimuladores da germinação) quanto alguns inibidores presentes na fumaça apresentam em sua estrutura um anel butenolídeo (lactona de 5 membros insaturada). A cumarina é outro exemplo de inibidor de germinação bem conhecido (ABENAVOLI *et al.*, 2006; MISRA; PATNAIK, 1959).

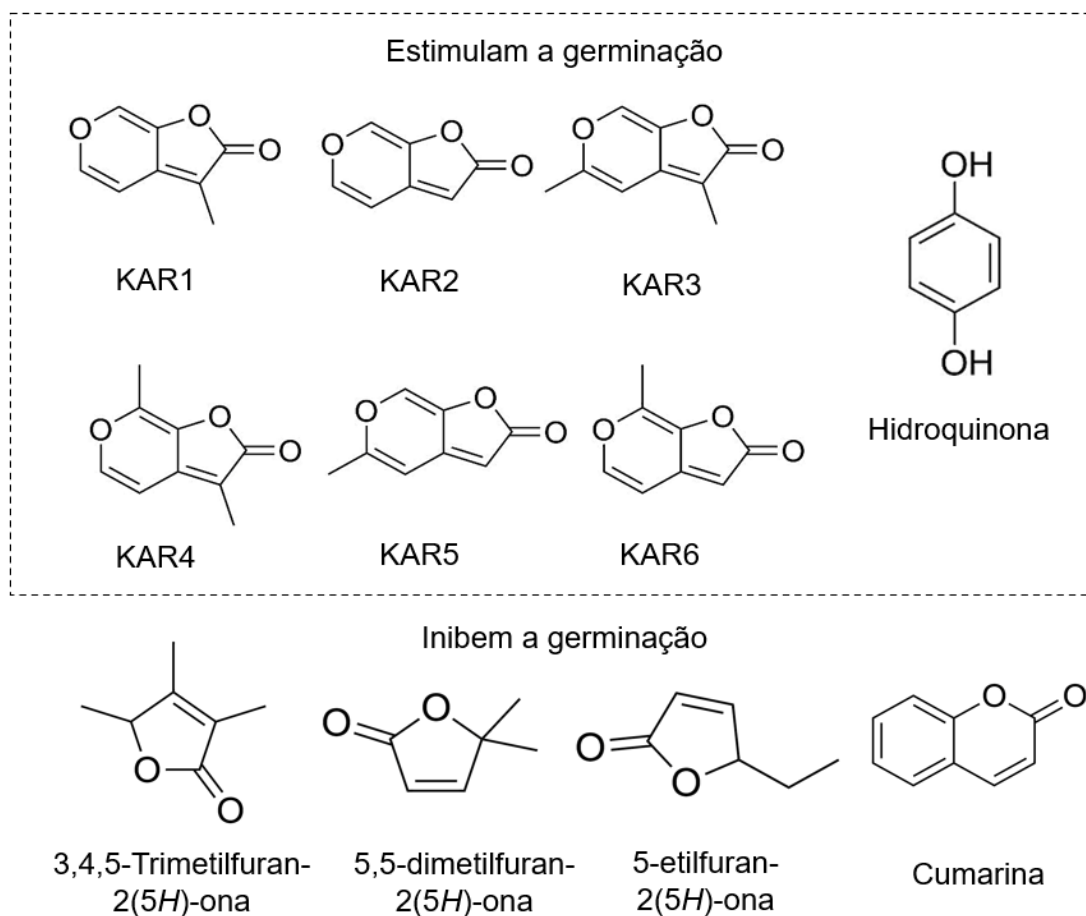


Figura 3. Compostos com efeito promotor e inibidor da germinação presentes nas soluções de fumaça (LIGHT *et al.*, 2010)

Boucher e Meets (2004) e Jäger *et al.* (1996) mostraram que o flavorizante de alimentos à base de EP de eucalipto destilado comercializado pela antiga empresa Haarmann and Reimer (SA), atual Symrise, também apresenta atividade promotora da germinação de sementes de alface (BOUCHER; MEETS, 2004; JÄGER; RABE; VAN STADEN, 1996). Boucher e Meets (2004) também avaliaram outros extratos de fumaça e ressaltaram a importância de se ter um controle de qualidade na aplicação dos diferentes extratos, tendo em vista as mudanças nos componentes ativos em função dos diferentes métodos de obtenção e das matérias primas empregadas.

Jothityangkoon *et al.* (2009) avaliaram o vigor das sementes de arroz tratadas com EP após serem submetidas a um teste de envelhecimento acelerado a 41 °C e observaram aumentos significativos na promoção da germinação das sementes tratadas com EP em relação às sementes tratadas com água (JOTHITYANGKOON *et al.*, 2009).

Adicionalmente, Dissatian *et al.* (2018) estudaram os efeitos do EP (1:300) na germinação de sementes de arroz de três variedades (Leum Pua, ULR038 e Sakon Nakhon). A aplicação do EP não só foi capaz de aumentar significativamente a germinação em relação ao controle não tratado, como também resultou em porcentagens de germinação superiores aos tratamentos com água destilada e CaCl_2 . Os autores relacionaram o efeito do EP à modulação do acúmulo de malondialdeído, produto secundário da peroxidação lipídica, utilizado como biomarcador para avaliação do estresse oxidativo. A redução acentuada do malondialdeído (propanodial) foi associada ao aumento da atividade de algumas enzimas antioxidantes, como a guaiacol peroxidase e ascorbato peroxidase e superóxido dismutase (DISSATIAN *et al.*, 2018).

Wang *et al.* (2019) investigaram o efeito do EP no desenvolvimento de sementes de trigo e indicaram que a concentração de 1:900 foi capaz de aumentar significativamente o crescimento das raízes e da parte aérea. Ao investigarem a resposta das raízes do trigo ao estresse hídrico induzido por polietileno glicol, os autores observaram que as mudas tratadas com EP foram menos afetadas negativamente, enquanto as mudas do grupo controle foram atrofiadas pelo estresse hídrico. Também foi relatado um aumento do teor de ácido abscísico (ABA), aumento na atividade de enzimas antioxidantes (peroxidase 8, peroxidase 1, pox1, peroxidase 70, L-ascorbato peroxidase 1, glutathione transferase, superóxido dismutase, monodesidroascorbato redutase e desidroascorbato redutase) e dos respectivos genes antioxidantes, assim como a redução das espécies reativas de oxigênio e malonaldeído no grupo tratado com EP em relação ao controle (WANG, Y. *et al.*, 2019).

As espécies reativas de oxigênio (O_2^- e H_2O_2) e o malonaldeído podem provocar lesões oxidativas às células e o tratamento com EP aprimorou o sistema de defesa antioxidante, reduzindo os danos oxidativos sob estresse hídrico e proporcionando um ambiente favorável para o crescimento e desenvolvimento das mudas. Segundo os autores, o tratamento com o EP, anteriormente à indução do estresse hídrico, permitiu a promoção da síntese do ABA, hormônio envolvido na preparação da defesa das plantas ao estresse, que possibilitou uma resposta mais rápida às condições de estresse ao regular a abertura estomática e a expressão de genes relacionados à defesa nas brotações e raízes de trigo, conferindo resistência. O pré-tratamento com EP também regulou o metabolismo de carboidratos, sob estresse hídrico, melhorando a síntese de carboidratos e a produção de ATP nas raízes do trigo (WANG, Y. *et al.*, 2019).

Ademais, Lu *et al.* (2019) também reportaram uma redução de 13% do malonaldeído em células das raízes de trigo provenientes de sementes tratadas com EP coletado entre 20 e 150 °C em relação ao controle e um aumento do malonaldeído para as espécies tratadas com líquidos de pirólise coletados acima de 150 °C. As raízes com menor conteúdo de malonaldeído apresentaram um maior crescimento e vigor. A promoção do crescimento pela ação do EP coletado entre 20 e 150 °C foi relacionada pelos autores à ação dos prótons na quebra da interação física entre o xiloglucano e outros compostos da parede celular. Favorecendo a absorção de H⁺, o EP promoveu a acidificação intercelular, que tornou as células mais propensas à divisão e diferenciação, estimulando o desenvolvimento do sistema radicular (LU, X. et al., 2019). Em contrapartida, os fenóis apresentam efeitos estimulantes de crescimento em baixas concentrações e efeitos inibitórios em altas concentrações. Além disso, os autores citaram o trabalho de Wang *et al.* 2015, que relatou efeitos reguladores diferentes para compostos fenólicos distintos. De acordo com os autores, os monofenóis tendem a inibir o crescimento das plantas, enquanto os difenóis ou polifenóis promovem o crescimento.

Tabela 7. Condições e efeitos da aplicação do extrato pirolenhoso na germinação de algumas culturas de interesse agrícola.

Cultura	País	Aplicação	Melhor diluição	Resultado	Referência
Canola	China	5 mL em filtro de papel (15 sementes)	1:100	O EP não destilado e o EP destilado a 98-130 °C inibiram a germinação. O destilado 0 - 98 °C e o destilado 130-220 °C favoreceram a germinação e o crescimento das raízes e parte aérea	(Shan, Liu, & Zhang, 2018)
Arroz	Tailândia	Imersão por 48 h	1:300	Aumentou a germinação em relação ao controle	(SIMMA <i>et al.</i> , 2017)
Milho	China	Imersão	1:300	A diluição de 1:300 promoveu um aumento de 35,09% na taxa de germinação em relação ao controle, enquanto a diluição de 1:100 inibiu a germinação (-45,3%)	(LING; ENCHEN; BOSONG, 2009)
Trigo	China	Em filtro de papel (30 sementes) por 7 dias	1:4000	Efeito promotor da germinação do EP coletado de 20 a 150 °C e efeito inibidor das amostras coletadas de 150 a 250 °C, 250 a 350 °C e 350 a 450 °C.	(LU, Xincheng <i>et al.</i> , 2019)

2.5 Efeito bactericida e fungicida do Extrato Pirolenhoso

Muitos artigos também têm demonstrado o efeito antifúngico e bactericida do EP. Gao *et al.* (2020) demonstraram o potencial de EP como fungicida natural para o controle de fusariose, uma doença destrutiva do trigo. O EP inibiu significativamente o crescimento de *Fusarium graminearum in vitro* e em ensaios de campo. Os autores relataram que o tratamento com a pulverização foliar do EP diluído a 1:200 apresentou eficácia no controle semelhante ao tratamento com fungicida químico (GAO *et al.*, 2020). Suresh *et al.* (2019) avaliaram a eficácia *in vitro* do EP bruto e neutralizado contra duas bactérias Gram-positivas e três Gram-negativas, conhecidos patógenos humanos, além de três cepas de fungos que causam a podridão da madeira e a contaminação de alimentos. O EP neutralizado mostrou-se mais eficaz contra todas as cepas bacterianas testadas em relação ao EP ácido, enquanto o EP ácido apresentou maior atividade fungicida em relação ao neutralizado (SURESH *et al.*, 2019).

Chen Yu-Hang *et al.* (2020) mostraram que o tratamento pós-colheita de uvas de mesa 'Red Globe' com EP diluído (200, 400 e 600 vezes) reduziu significativamente a incidência e gravidade da doença causada pelo fungo *Botrytis cinerea*, além de reduzir os danos causados pelo estresse oxidativo (CHEN, Y. *et al.*, 2020). Seis dias após a infecção o conteúdo de espécies reativas de oxigênio (ROS) do controle não tratado foi significativamente superior ao dos grupos tratados com EP.

Uma revisão sistemática sobre o uso do EP como agente antimicrobiano foi publicada por Souza *et al.* (2018). Esses autores resumiram em tabelas as informações dos artigos sobre os microrganismos testados, tipo de EP, concentração, métodos de avaliação da atividade antimicrobiana e área de aplicação (SOUZA *et al.*, 2018). Da mesma forma, Mattos *et al.* (MATTOS *et al.*, 2019) também publicaram uma revisão sobre a atividade biocida dos bio-óleos de pirólise. Apesar disso, mais pesquisas na área se fazem necessárias. O grande número e a grande variabilidade de componentes, associados aos possíveis efeitos sinérgicos, dificultam a identificação dos mecanismos envolvidos nos efeitos bactericidas e fungicidas dos extratos pirolenhosos (LINGBECK *et al.*, 2014).

2.6 Efeito repelente

O efeito repelente também é outro benefício reportado na literatura relacionado à aplicação do EP na agricultura. A patente US 2018/0184652 dos Estados Unidos, por exemplo, aborda a repelência do EP contra o inseto disseminador do *greening* cítrico, doença devastadora, sem cura, provocada pela bactéria *Candidatus liberibacter sp.* Nos ensaios foi utilizada a metodologia de teste de duas escolhas (“Two-choice study”) para determinar a preferência do inseto em residir, e presumivelmente se alimentar de plantas com ou sem a aplicação do EP. Para a realização dos testes, aproximadamente 75 adultos foram liberados em um invólucro de malha fina de 1,5 m contendo duas mudas de laranja com 0; 0,001; 0,01; 0,1 ou 1% de EP. Após 48 horas, a localização dos adultos em relação às duas mudas foi avaliada e registrada como probabilidade de preferência do hospedeiro. Os resultados mostram que as mudas cítricas tratadas com EP foram menos propensas a servir como hospedeiras para o psíldeo disseminador do *greening* e que a probabilidade de infecção diminuía surpreendentemente, conforme a porcentagem de EP aumentava na faixa de 0,001 a 1,0%.

A mesma patente também relata o potencial repelente do EP contra uma das principais pragas lepidópteras de nozes e amêndoas (*Navel orangeworm, Amyelois transitella*). As fêmeas da espécie *Amyelois transitella* são conhecidas por ovipositar em amêndoas/nozes, com um aumento pronunciado concomitante com o início da rachadura do casco, um período de senescência que precede a colheita em aproximadamente 30 dias. A resposta de voo das fêmeas de *Amyelois transitella* aos sinais olfativos das amêndoas foi bioensaiada em um túnel de voo e avaliada comparativamente em relação às amêndoas tratadas com EP. A resposta aos sinais olfativos da amêndoa com casco rachado foi avaliada durante vários dias consecutivos após o tratamento das amêndoas com EP a 0,01%. A atração das fêmeas pelas amêndoas tratadas foi inicialmente suprimida e levou de 5 a 6 dias para retornar aos níveis esperados para amêndoas não tratadas.

2.7 Efeito do Extrato Pirolenhoso no solo

Embora apresente compostos com atividade antimicrobiana, dependendo da concentração aplicada, o EP pode estimular o desenvolvimento da microbiota benéfica do solo

(STEINER *et al.*, 2008; ZHANG, Rui *et al.*, 2014), além de aumentar o conteúdo de carbono, remover carbonatos indesejados e aumentar a porosidade (UTHAYAKUMAR; PRABAKAR; AZIS, 2011).

Steiner *et al.* (2008) avaliaram o efeito da aplicação do EP no tamanho da população microbiana por meio da respiração basal e da respiração induzida por substrato, com medições horárias da produção de dióxido de carbono (CO₂) durante um período de 65 h após a adição de glicose (240 mg). O método se baseia no fato de que quando substratos facilmente degradáveis, como glicose, são adicionados ao solo, é observado um aumento imediato da taxa de respiração, cujo tamanho é considerado proporcional ao tamanho da biomassa microbiana. O EP promoveu um aumento significativo da respiração basal, da biomassa microbiana e da taxa de crescimento populacional. A respiração induzida por substrato também foi significativamente afetada pelo EP que promoveu um aumento exponencial mais acelerado em relação às amostras que foram tratadas apenas com carvão vegetal (STEINER *et al.*, 2008).

Zhang *et al.* (2014) acompanharam as alterações microbianas que ocorreram no solo após a pulverização do EP diluído 300 e 500 vezes em uma cultura de tomate em Pequim. Para realização do estudo, quatro dias após o plantio dos tomates, cada parcela (25 m²/parcela; 3 replicatas por tratamento) foi pulverizada com 1200 mL de EP em diferentes concentrações (0, 0,2 e 0,33%) e foram coletadas amostras de solo frescas de 0 a 20 cm de cada parcela (25m²/parcela; 3 replicatas por tratamento) nos dias 1, 3, 6, 10 e 15 após a pulverização. A estrutura da comunidade microbiana foi investigada por meio do Método de Ácidos Graxos de Fosfolipídios (PLFA) que inclui a análise de uma mistura de ácidos graxos extraídos do solo por cromatografia gasosa. Os perfis de ácidos graxos são empregados como biomarcadores de grupos taxonômicos como fungos, bactérias Gram-negativas, bactérias Gram-positivas e actinomicetos. A aplicação do EP, principalmente na concentração 0,2%, resultou em um aumento significativo na quantidade microbiana total do solo, por meio da promoção do crescimento da população bacteriana (bactérias Gram-negativas, bactérias anaeróbicas, bactérias aeróbicas), que era a componente dominante (90%) da microbiota do solo. Os efeitos foram máximos três dias após a aplicação e tenderam a alcançar níveis semelhantes ao controle no 15º dia. Como a população de fungos e actinomicetos no solo estudado eram baixas e em algumas vezes indetectáveis, não foi possível estabelecer uma correlação clara sobre o efeito do EP nesses grupos, entretanto aparentemente foi observado um efeito estimulante para os actinomicetos (ZHANG, R. et al., 2014).

Na compostagem, o EP também apresenta grandes benefícios como, por exemplo, na redução do tempo de maturação e aumento dos teores de carbono, nitrogênio e outros macronutrientes e micronutrientes. Em 2006, foi iniciado um projeto, denominado JAEC, em Benguet (Filipinas), destinado a ajudar os agricultores a cultivarem o solo utilizando materiais orgânicos, como o carvão vegetal e o EP. Um relatório deste projeto foi publicado em 2011 com os relatos dos agricultores e os benefícios do EP observados por eles. Para compostagem foi indicada a diluição de 4 litros de EP em 200 litros de água e aplicação sobre 3000 quilos de material orgânico (gramíneas, ervas daninhas, palha de arroz, dejetos de animais, etc).

Wang *et al.* (2018) mostraram que o EP (2%), juntamente com o carvão vegetal (biochar) e zeólitas podem reduzir a emissão de gases do efeito estufa, encurtar a fase termofílica e melhorar a maturidade do composto, além de reduzir a perda de nitrogênio e carbono.

Lu *et al.* (2015) investigaram os efeitos da aplicação do EP diluído 5 vezes ($0,15 \text{ t ha}^{-1}$), seguida da aplicação de um composto de biocarvão e esterco de aves (12 t ha^{-1}), após uma semana, sobre o crescimento e a atividade microbiana em solos com estresse salino na cultura de milho em campo. Foram avaliadas amostras de solo superficiais (0 a 10 cm) e amostras de solo da rizosfera (6 de cada amostra por parcela de $0,15 \text{ ha}$) coletadas no estágio de crescimento vegetativo do milho. Os autores reportaram um aumento do conteúdo de carbono e nitrogênio microbiano do solo, conhecidos como indicadores gerais de crescimento microbiano. Também foram reportadas maiores atividades das enzimas urease, invertase e fosfatase no solo (LU, Haifei *et al.*, 2015).

2.8 Remoção e redução da mobilidade de metais pesados

Alguns metais pesados como arsênio (As), cádmio (Cd), cobalto (Co), mercúrio (Hg), manganês (Mn), níquel (Ni), chumbo (Pb) são conhecidos pelo efeito genotóxico em sistemas biológicos. Enquanto, outros metais pesados, em concentrações traços, são essenciais para o crescimento das plantas, como por exemplo, o cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn), embora também sejam tóxicos em concentrações elevadas. A fitorremediação é uma das alternativas para descontaminação de áreas com elevados teores de metais pesados e a associação com o EP tem se mostrado uma ferramenta valiosa nesse processo (BENZON; LEE, 2017).

Com o intuito de estudar o potencial do EP na fitorremediação de áreas contaminadas com metais pesados, Benzon e Lee (2017) avaliaram a disponibilidade desses metais nos solos e o crescimento da mostarda, através dos teores de clorofila, de nutrientes, da biomassa e da capacidade de captação de metais. Os experimentos foram realizados em casa de vegetação na Coreia do Sul com solos contaminados por minas de carvão. Foram avaliadas as concentrações de EP iguais a 1% (1:100), 0,4% (1:250); 0,2% (1:500) em aplicações semanais e quinzenais de 500 mL por vaso (5 kg) iniciadas uma semana após a germinação das sementes de mostarda. Os experimentos finalizaram no estágio de floração, cerca de oito semanas após a germinação. Os tratamentos com EP em todas as concentrações avaliadas aumentaram o teor de clorofila total e a biomassa da mostarda, sendo que os melhores resultados foram obtidos nas aplicações com 0,4% (1:250), onde observou-se um aumento de 13% no teor de clorofila, 132% no peso fresco e 126% no peso seco da mostarda, com as aplicações semanais do EP. Todas as diluições de EP avaliadas reduziram as concentrações dos metais no solo em relação ao controle. A aplicação semanal na diluição de 250× foi a que apresentou maior redução percentual em relação ao controle, sendo elas iguais a 36,9%, 38,5%, 39,9%, 36,4%, 39,6%, 35,8% e 32,2% para os metais Cu, Ni, Pb, Zn, Cr, Mn, Fe, respectivamente. A aplicação do EP além de diminuir a concentração de metais no solo também inibiu a captação de metais através da fitoestabilização, sem alterar a maioria das propriedades do solo necessárias para o crescimento das plantas. Esse processo reduziu a mobilidade dos metais e a biodisponibilidade para entrada na cadeia alimentar (BENZON; LEE, 2017).

Alguns pesquisadores também têm estudado a aplicação do EP e do biocarvão na compostagem para redução da mobilidade de contaminantes no composto. Chen, Y. *et al.* (2010) observaram resultados positivos em relação à imobilização dos metais Cu e Zn e na redução da perda de nitrogênio durante a compostagem de esterco de porco, com a aplicação do EP. Os melhores resultados em relação à perda de nitrogênio foram observados com a aplicação de 3% de carvão + 0,4% de EP na qual foi promovida uma redução de 74% na perda de nitrogênio, valor significativamente superior à redução de 28% promovida pela aplicação apenas do carvão a 3%. De acordo com os autores tal efeito está relacionado ao alto conteúdo de ácidos orgânicos no EP que reduzem a perda de nitrogênio pela neutralização da amônia. Os autores atribuíram a menor mobilidade dos íons de Cu e Zn ao efeito adsorvente do carvão, à promoção da atividade microbiana e a formação de húmus, que leva a imobilização dos metais pela formação do complexo metal-húmus. A aplicação do EP e biocarvão também reduziram o

tempo necessário para alcançar a fase termofílica e aumentaram o índice de germinação que é usado como um indicador biológico para avaliar a toxicidade e a maturidade do composto (CHEN, Y. et al., 2010).

Liu *et al.* (2018) avaliaram o efeito do EP sobre a capacidade de adsorção de metais pesados em compostos secundários produzidos a partir de resíduos municipais. Os resultados reportados pelos autores mostram que o tratamento dos compostos com o EP aumentou a eficiência de adsorção dos metais, reduziu a dessorção e reduziu os efeitos de competição entre os metais pelos sítios ativos do adsorvente (LIU, L. et al., 2018). Tendo em vista que a adsorção de metais em compostos é realizada, principalmente, por complexação dos metais com grupos funcionais de superfície, como os grupos carboxila, sugere-se que o aumento da eficiência de adsorção dos compostos tratados com EP esteja relacionado ao aumento dos grupos de superfície, devido à formação de complexos. Os compostos tratados com EP também apresentaram uma superfície mais irregular, mais áspera, maior área superficial e maior volume de poros em comparação com o composto não tratado, características que favorecem adsorção.

2.9 Efeito bioestimulante

O EP se enquadra no conceito de bioestimulante vegetal de Du Jardin, (2015): “Um bioestimulante vegetal é qualquer substância ou microrganismo aplicado às plantas com o objetivo de aumentar a eficiência nutricional, a tolerância ao estresse abiótico e/ou as características de qualidade da cultura, independentemente do seu teor de nutrientes” (DU JARDIN, 2015). Entretanto, pouco se sabe sobre quais são as moléculas e mecanismos envolvidos em seu efeito bioestimulante. Algumas classes de compostos com conhecida ação bioestimulante, como os aminoácidos e os ácidos húmicos (AH) e fúlvicos (AF), podem estar envolvidas, entretanto, não se tem conhecimento de trabalhos que quantificaram amplamente esses compostos no EP.

2.9.1 Aminoácidos

Existem diversos estudos na literatura que avaliam os efeitos da aplicação exógena de aminoácidos na agricultura, como estimuladores naturais do crescimento das plantas, visando melhorar o rendimento e a qualidade das safras.

Os aminoácidos desempenham múltiplos papéis como bioestimulantes do crescimento das plantas, que incluem: i) efeitos diretos na modulação da captação e assimilação do N, pela regulação de enzimas e ações nas vias de sinalização, ii) efeitos quelantes, que contribuem na mobilidade e aquisição de micronutrientes, além de proteger as plantas contra metais pesados, e iii) atividade antioxidante pela eliminação de radicais livres, conferindo proteção contra o estresse abiótico (DU JARDIN, 2015).

Teixeira *et al.* (2018) avaliaram o efeito da aplicação de aminoácidos isolados em algumas etapas do metabolismo do nitrogênio da soja e na produtividade. A aplicação isolada de cisteína, fenilalanina, glicina, glutamato e o conjunto desses aminoácidos no tratamento de sementes aumentou a produtividade das plantas de soja no experimento de campo em pelo menos 22% (TEIXEIRA, Walquíria F. *et al.*, 2018).

2.9.2 Ácidos orgânicos

Estudos relatam que a exsudação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular pelas plantas é um dos mecanismos chaves para aumentar a absorção de nutrientes, principalmente de ferro e cálcio do solo (DAKORA; PHILLIPS, 2002).

Os ácidos orgânicos, incluindo os ácidos húmico (AH) e fúlvico (AF), podem solubilizar e inibir a precipitação de minerais fosfatados, aumentar a biodisponibilidade e facilitar a mobilidade do fósforo até a planta, uma vez que os ácidos orgânicos interagem com cátions metálicos multivalentes e, portanto, competem com PO_4^{3-} para ligação catiônica (YANG *et al.*, 2019).

2.9.3 Ácidos húmicos e fúlvicos

As substâncias húmicas são constituintes naturais da matéria orgânica do solo, resultantes da decomposição de resíduos vegetais, animais e microbianos. Consistem em misturas supramoleculares heterogêneas com peso molecular de algumas centenas ou milhares de gramas por mol, que se associam dinamicamente por meio de interações fracas (não covalentes), especialmente ligações de hidrogênio e forças hidrofóbicas (ORSI, 2014).

Diversos trabalhos envolvendo modelos moleculares computacionais foram desenvolvidos e aplicados para estudar e esclarecer as estruturas das substâncias húmicas (ORSI, 2014). Um dos modelos mais conhecidos, o TNB (de Temple-Northeastern-Birmingham), buscou representar, a partir de dados experimentais, uma molécula típica de substância húmica, 'média', contendo três grupos carboxílicos, três grupos carbonila, dois grupos fenólicos, dois grupos amino e quatro outros grupos de hidroxila alcoólica R-OH, com uma fórmula química total de $C_{38}H_{39}O_{16}N_2$ e um peso molecular de 753 g mol^{-1} .

As substâncias húmicas podem ser divididas em três frações principais: ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e huminas. Os ácidos húmicos se diferenciam dos fúlvicos pela insolubilidade em água em pH abaixo de 2. Normalmente, os ácidos húmicos apresentam maior teor de carbono, menor teor de oxigênio, maior razão C/H, indicando uma maior aromaticidade e maior condensação das estruturas. Os ácidos húmicos são precipitados pela adição de ácido forte (ajuste para pH 1 com HCl), enquanto os ácidos fúlvicos são solúveis em toda faixa de pH. A fração humina é completamente insolúvel e não pode ser extraída do solo, nem com a utilização de bases ou ácidos fortes, logo não estão presentes em amostras líquidas como o EP.

Dentre os efeitos benéficos da aplicação das substâncias húmicas no desenvolvimento vegetal e na fertilidade do solo, Du Jardin (2015) destaca: i) o aumento da captação de macro e micronutrientes, devido ao aumento da capacidade de troca catiônica do solo, ii) o aumento da disponibilidade de fósforo, através da solubilização de fosfatos insolúveis (YANG *et al.*, 2019), iii) estimulação H^+ -ATPases da membrana plasmática, que convertem a energia livre liberada pela hidrólise do ATP em um potencial eletroquímico transmembrana usado para a importação de nitrato e outros nutrientes, iv) afrouxamento da parede celular, aumento da célula e crescimento de órgãos favorecido pelo bombeamento de prótons pelas ATPases da membrana plasmática, v) aumento da respiração e atividades de invertase, fornecendo substratos de carbono, vi) envolvimento na sinalização das vias hormonais das plantas, através da liberação

de compostos hormonais aprisionados ou estimulação de micro-organismos produtores de hormônios, vii) além do envolvimento na modulação de resposta ao estresse.

Uma meta-análise e revisão da resposta do crescimento da planta às substâncias húmicas, publicada em 2014, demonstrou um aumento de peso seco geral de $22 \pm 4\%$ para brotos e de $21 \pm 6\%$ para raízes (ROSE *et al.*, 2014).

2.10 Extrato Pirolenhoso na inibição da urease

Os fertilizantes nitrogenados são os mais consumidos no mundo. De acordo com dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), o consumo de fertilizantes nitrogenados em 2017 foi igual a 5,1 milhões de toneladas no Brasil e 109 milhões de toneladas em todo o mundo (FAOSTAT, 2020). Destes, 50% foram aplicados na forma de ureia (Figura 4), principalmente devido a seu custo relativamente baixo por unidade de nitrogênio (N), fácil acesso, compatibilidade com a maioria dos fertilizantes, elevado teor de N (46%), alta solubilidade em água e alta absorção foliar, entre outros (MODOLO *et al.*, 2018).

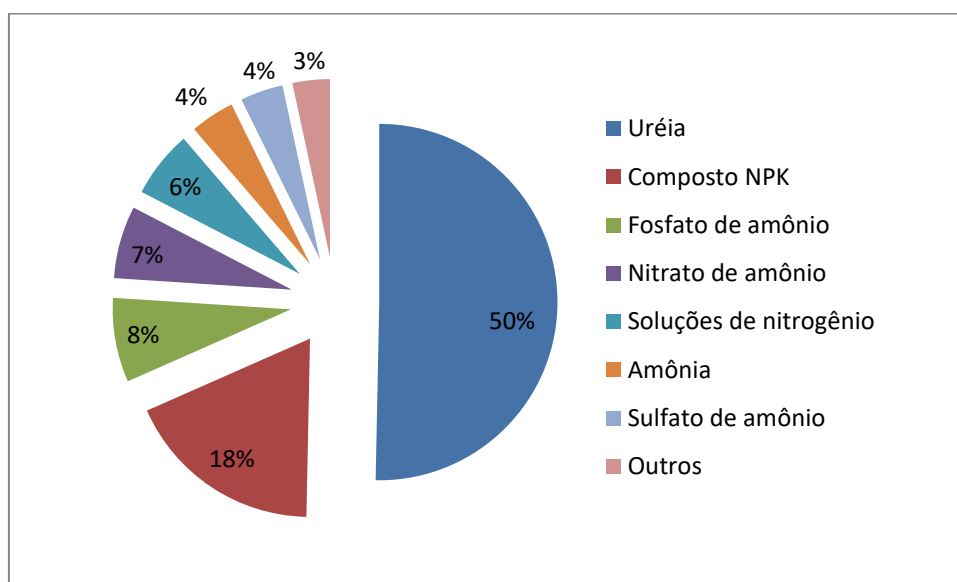


Figura 4: Proporção de consumo mundial de fertilizantes nitrogenados por tipo (IFASTAT, 2017)

Infelizmente, grande parte do nitrogênio aplicado na forma de ureia não é efetivamente aproveitada pela planta, sendo perdida por volatilização ou lixiviação, contribuindo direta ou indiretamente para chuvas ácidas, eutrofização e poluição atmosférica. Isso porque ao ser

aplicada ao solo, a ureia é rapidamente hidrolisada pela ação da urease, enzima produzida e liberada por plantas e microrganismos, levando a formação dos gases dióxido de carbono e amônia.

A amônia volatilizada a partir da hidrólise da ureia contribui para a formação de partículas finas de amônia, que são depositadas na superfície do solo e podem ser convertidas em nitrogênio inorgânico por processos microbiológicos. O nitrogênio inorgânico, por sua vez, é suscetível à formação de óxido nitroso (N_2O), um potente gás de efeito estufa.

As perdas diretas de N do fertilizante aplicado nos sistemas agrícolas convencionais variaram de 10% a 78%, em média, sendo que 40% do nitrogênio da ureia pode ser perdido em poucos dias após a aplicação (LIU et al., 2019). O não aproveitamento integral do nitrogênio leva o agricultor a aplicar uma dose ainda maior de fertilizante para compensar as perdas, que resultam em maiores gastos e maior impacto no ecossistema natural. O outro efeito negativo é o acúmulo de NO_2^- , que pode danificar sementes em germinação, mudas e plantas jovens.

Com o intuito de minimizar as perdas por volatilização e lixiviação, inibidores de urease e de nitrificação têm sido desenvolvidos (LIU et al., 2019) para aplicação juntamente aos fertilizantes à base de ureia, promovendo a desaceleração da hidrólise e a incorporação de ureia no solo.

O EP pode ser uma excelente opção para reduzir a perda de nitrogênio, seja pela acidificação do meio ou por meio da inibição da urease por alguns de seus mais de 200 compostos.

A inibição da nitrificação pelo EP foi estudada em 2000 por um grupo de pesquisadores da Coreia do Sul (KIM, MK; PARK; LIM, 2000). De acordo com Win *et al.* (2009) a aplicação do EP reduz a volatilização de NH_3 em solos fertilizados com esterco anaerobicamente digerido, através da acidificação e transformação do NH_3 em NH_4^+ . Entretanto, a acidificação não é o único mecanismo de ação do EP. Shibutani *et al.* (2018) demonstraram os efeitos redutores da volatilização da amônia promovido pelo EP neutralizado, indicando que sua ação não está apenas atrelada a redução do pH.

Park e Park (2017) estudaram a ação do resíduo de destilação a vácuo do EP solubilizado em metanol (100, 1000 e 10.000 mg L^{-1}) sobre a inibição da atividade da enzima urease *in vitro* pelo método de azul de indofenol. Foi avaliada a inibição tanto da urease de *Jack bean* quanto da urease de *Bacillus pasteurii*. No tratamento com 10.000 mg L^{-1} , 83% da atividade da urease de *Jack bean* foi inibida em comparação ao controle, enquanto nos tratamentos com 1000 e 100

mg L⁻¹ as inibições foram de 38 e 11%, respectivamente. Para a urease de *Bacillus pasteurii* a inibição foi de 90, 55 e 15% para as concentrações 10.000, 1.000 e 100 mg L⁻¹, respectivamente.

Park e Park (2017) também avaliaram o efeito de inibição da urease promovido pelo resíduo da destilação a vácuo do EP solubilizado em metanol (100, 1000 e 10.000 mg L⁻¹) aplicando-o diretamente no solo, juntamente com a ureia. Para esse ensaio o teor de umidade do solo foi ajustado para 30% e foram adicionados 100 mg de ureia juntamente com o 1 mL da solução de resíduo de EP com metanol em 20 g de solo. O teor de umidade foi então ajustado novamente para 60% e as amostras de solo foram incubadas por 10 dias a 35 °C. Após esse período, 2 g de solo foram extraídas com 20 mL de KCl 2M por 30 minutos, seguida de filtração e quantificação pelo método de indofenol. O tratamento do solo com a concentração de 100 mg L⁻¹ não diferiu estatisticamente do controle, embora tenha resultado em um leve aumento (8%). Em contrapartida, os autores reportaram uma inibição da urease de 88% quando o solo foi tratado com a concentração de 10.000 mg L⁻¹ e cerca de 55% quando tratado com 1.000 mg L⁻¹ (PARK; PARK, 2017).

Entretanto, novos trabalhos de avaliação do EP na inibição da urease são necessários, tendo em vista que nesse trabalho foram avaliados os resíduos da destilação do EP e não o EP bruto. Uma vez submetido ao aquecimento para destilação, muitas moléculas do EP são removidas e outras são modificadas devido às reações entre os próprios componentes. Sendo, portanto, esperado que o EP líquido apresente resultados diferentes.

Shi *et al.* (2020) avaliaram a aplicação de um composto produzido com ureia, carvão e minerais argilosos (bentonita e sepiolita) umedecido com EP como uma alternativa ao fertilizante de ureia convencional para redução da perda de N e melhora da nutrição de N na cultura do milho. Os resultados indicaram que além de se mostrar capaz de liberar lentamente e preservar uma alta proporção de amônio/nitrato por um período mais longo, o composto ainda promoveu o maior crescimento do milho e maior eficiência do uso de nitrogênio para a produção de biomassa através do aumento da absorção de N e do desenvolvimento das raízes (SHI *et al.*, 2020).

Sun *et al.* (2020) conduziram experimentos com o mesmo intuito de avaliar o efeito do EP (5 e 10 t ha⁻¹ de EP) associado ou não ao biocarvão (7 t ha⁻¹ de EP) na volatilização de NH₃ em solo de arroz fertilizado com ureia (240 kg N ha⁻¹). Os autores avaliaram o pH da água no solo, o conteúdo de NH₄⁺ no solo e a atividade da enzima urease, além dos rendimentos da cultura. Os resultados mostraram que o tratamento com aplicação de 5 t ha⁻¹ de EP aumentou o

rendimento de grãos de arroz em até 11,2% em comparação ao controle (SUN *et al.*, 2020). A combinação do EP ao biocarvão promoveu a redução da atividade da enzima urease e reduziu a volatilização de NH_3 , entretanto a aplicação do EP isoladamente não foi diferente estatisticamente do controle em relação à atividade da enzima urease. Tal resultado é divergente dos resultados reportados por Park e Park (2017), mas semelhante ao reportado por Cheng *et al.* (2017). Em nenhum dos trabalhos foram analisadas diferentes amostras de EP ou caracterizada profundamente a composição química das amostras testadas, associando a composição aos mecanismos de inibição.

Como a aplicação do EP no solo também promove o desenvolvimento da microbiota, alguns artigos reportam um aumento da atividade de enzimas como a urease, invertase, fosfatase alcalina e desidrogenase, com o uso do EP (CHENG *et al.*, 2017; LU, H. *et al.*, 2015). Por isso, a importância de se realizar os testes de avaliação da atividade da urease tanto *in vitro* quanto no solo.

2.11 Mecanismos de ação dos inibidores de urease conhecidos

A urease é uma metaloenzima, contendo níquel, encontrada em bactérias, algas, fungos e plantas. Embora existam diferenças no número de subunidades entre as ureases produzidas pelos diferentes organismos, a estrutura do sítio ativo na vizinhança dos íons de níquel (II) é conservada e induz o mesmo mecanismo de atividade catalítica (KAFARSKI; TALMA, 2018).

O sítio ativo é composto por dois íons de níquel conectados por uma hidroxila coordenada em ponte e por uma lisina carbamilada. Cada íon metálico também está coordenado a dois resíduos de histidina e a uma molécula de água. Adicionalmente, o íon de Ni^{2+} está ligado a um resíduo de aspartato (NORDLANDER; CARLSSON, 2010).

O mecanismo mais aceito hoje de ligação da ureia ao sítio ativo da urease foi inicialmente proposto por Benini *et al.* (1999) no qual a ureia desloca as moléculas de água e se liga aos dois íons de níquel em um modo bidentado estabilizado por ligações de hidrogênio, promovendo sua ativação, seguida pelo ataque nucleofílico do íon hidróxido em ponte ao C carbonílico da ureia desenvolvendo um estado de transição do tipo tetraédrico. Posteriormente, a amônia é descarregada do sítio ativo acompanhada por um carbamato carregado negativamente. Este último é quebrado instantaneamente, gerando outra molécula de amônia (BENINI *et al.*, 1999).

Existem basicamente três categorias de inibidores da urease. Alguns inibidores se ligam ao sítio ativo, enquanto outros bloqueiam o acesso ao sítio ativo pelo substrato. Uma terceira categoria de compostos inibidores atua sequestrando o íon Ni^{2+} , inativando assim a urease (SVANE *et al.*, 2020). Os ácidos hidroxâmicos, por exemplo, são fortes inibidores da urease devido à sua capacidade de formar quelatos ambidentados com íons metálicos. O grupo —CONHO^- dos ácidos hidroxâmicos compete com a ureia pelo sítio ativo, ligando-se aos íons de níquel (ARORA; ISSAR; KAKKAR, 2018). Outros inibidores de urease análogos de substrato que se ligam ao sítio ativo são o ácido bórico e a hidroxíureia (SVANE *et al.*, 2020).

O pirocatecol foi considerado um inibidor polifenol promissor para aplicação no solo (BREMNER; DOUGLAS, 1971). De acordo com Mazzei *et al.* (2017) a inativação da urease pelo pirocatecol (PC) se dá pelo bloqueio do sítio ativo através da reação do derivado da oxidação do pirocatecol (OSQ) com o resíduo de αCys322 localizado na aba que modula a abertura e o fechamento do canal do sítio ativo, conforme Figura 5. Segundo os autores esse mecanismo parece ser comum aos inibidores de urease poli-hidroxilados aromáticos e benzoquinonas. Quando é utilizada esta categoria de inibidores, a ureia é impedida estericamente de atingir o centro catalítico de Ni (MAZZEI, L. *et al.*, 2017a).

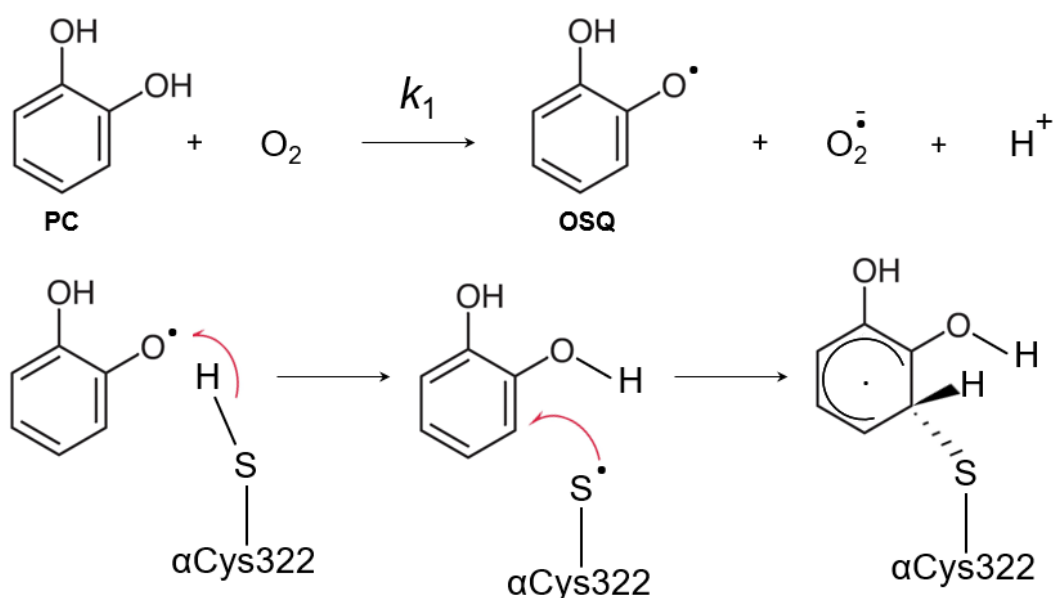


Figura 5: Mecanismo de inibição da urease proposto para o pirocatecol (MAZZEI, Luca *et al.*, 2017a)

O mesmo mecanismo (Figura 5) tem sido associado a vários compostos aceptores de Michael (compostos carbonilados α,β -insaturados), dentre eles a benzoquinona, a ciclopentenona e a ciclo-hexenona (MACEGONIUK *et al.*, 2017; MAZZEI, L. *et al.*, 2016; SVANE *et al.*, 2020; TANAKA; KAWASE; TANI, 2003). Os compostos carbonilados α,β -insaturados, possuem uma ligação dupla entre os carbonos α e β conjugada com a carbonila. Quando a ligação múltipla C-C está conjugada com o grupo carbonila, que é um grupo retirador através de efeito mesomérico, um nucleófilo pode atacar a posição β , também chamada de posição 4. Essa reação é chamada adição 1,4, adição conjugada ou adição de Michael. Em geral, nucleófilos mais moles, preferem atacar na posição β , que é o centro eletrofílico mais mole, ou seja, com menor carga concentrada. O resíduo de cisteína (α Cys322), neste caso, atua como um nucleófilo mole atacando a posição β dos inibidores aceptores de Michael, impedindo estericamente a ureia de acessar o centro catalítico da urease.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo avaliar diferentes extratos pirolenhosos (EPs) como inibidores da urease, bem como realizar uma caracterização dos extratos para estudo dos possíveis compostos envolvidos na inibição da urease.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar amostras de EP de diferentes biomassas (eucalipto, acácia negra e casca de coco) e diferentes processos produtivos (forno de alvenaria e forno metálico) quanto à acidez, pH, índice de refração (°Brix), teores de fenóis, teor de açúcares, ácido húmicos e fúlvicos, micro e macronutrientes.
- Identificar os principais compostos presentes no EP por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de massas (CG-EM) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), incluindo a quantificação dos aminoácidos e HPAs.
- Avaliar as diferentes amostras de EP quanto ao seu potencial inibidor da urease *in vitro*.
- Identificar alguns dos principais compostos presentes no EP envolvidas na inibição da urease.
- Realizar um estudo de docking molecular dos principais compostos inibidores da urease identificados no EP.
- Avaliar a inibição da urease pelo EP no solo em sistema fechado com fluxo de ar contínuo, utilizando como controle positivo o NBPT (*N*-(*n*-butil) tiofosfórico triamida), o mais bem sucedido inibidor da urease do mercado.

4 METODOLOGIA

4.1 Amostras

Foram analisadas quatro amostras comerciais de EP fornecidas pela empresa Extrato Pirolenhoso do Brasil. As amostras se diferenciam pela biomassa (casca de coco, acácia negra e eucalipto) e pelo tipo de forno utilizado no processo produtivo (forno metálico ou de alvenaria) - Tabela 8.

Tabela 8. Identificação das amostras analisadas

Identificação	Biomassa	Tecnologia de Produção
1.EPCE	Eucalipto (<i>Eucalyptus urograndis</i>)	Forno Container Metálico Industrial
2.EPAE	Eucalipto (<i>Eucalyptus urograndis</i>)	Forno de Alvenaria
3.EPCC	Casca de Coco (<i>Cocus nocifera</i>)	Forno Piloto Metálico
4.EPAN	Acácia Negra (<i>Acacia mearnsii</i>)	Forno de Alvenaria

Os EPs foram obtidos pela condensação de uma fração dos gases gerados na carbonização dessas biomassas. Nos fornos de alvenaria, tradicionalmente usados no Brasil na produção de carvão vegetal, a carbonização dura em média três a quatro dias. O resfriamento do carvão nos fornos de alvenaria é realizado no interior do forno, o que faz com que um ciclo completo de produção dure em torno de doze dias. O forno utilizado na carbonização de casca de coco consiste em um forno metálico em escala piloto com carbonização de 30 horas. O resfriamento do carvão também ocorre no interior do forno e dura em torno de 66 horas. No Forno Container a carbonização é acelerada por uma exaustão forçada dos gases, o que permite que o processo de carbonização ocorra em um período de 4-5 horas. As entradas de ar são reguladas por válvulas automáticas e o resfriamento do carvão é realizado fora do forno, em cilindros. Em todos os processos produtivos a temperatura máxima empregada na carbonização foi de aproximadamente 450 °C.

4.2 Caracterização do extrato pirolenhoso

4.2.1 Macro e Micronutriente

Os macronutrientes (nitrogênio, potássio, fósforo, cálcio, magnésio e enxofre), micronutrientes (cobre, ferro, manganês, molibdênio, zinco e boro), além do sódio, alumínio e cobalto, presentes nas amostras de EP, foram determinados, conforme métodos descritos no Manual de Métodos Analíticos Oficiais para Fertilizante e Corretivos, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2017).

O fósforo total foi determinado conforme o método Gravimétrico do Quimociac, que consiste na solubilização do fósforo da amostra por extração ácida e posterior precipitação do íon ortofosfato como fosfomolibdato de quinolina, o qual é filtrado, seco e pesado.

O nitrogênio foi determinado conforme o Macrométodo da Liga de Raney que se fundamenta na amonificação de todas as formas não amoniacais de nitrogênio, seguida da destilação alcalina da amônia, que é recebida em uma solução de ácido bórico. O borato de amônio formado é titulado com solução ácida padronizada.

Os teores de cálcio, magnésio, alumínio, cobalto, cobre, ferro, manganês, molibdênio e zinco foram determinados em Espectrofotômetro de Absorção Atômica (Agilent mod 55B) com abertura de amostra por digestão ácida, enquanto os teores de potássio e sódio foram determinados por método Espectrométrico por Emissão.

Para determinação do teor de enxofre utilizou-se o método gravimétrico do sulfato de bário. O método baseia-se na oxidação de todas as formas de enxofre a sulfato de enxofre por peróxido de hidrogênio em meio alcalino e precipitação como sulfato de bário.

O teor de boro foi determinado conforme Método Espectrofotométrico da Azometina-H com absorção em 420 nm. Nesse método o ácido bórico age como catalisador, acelerando a reação de condensação do ácido 4-amino-5-hidroxi-2,7-naftalenodissulfônico e aldeído salicílico em azometina-H, que tem coloração amarela. A intensidade da cor aumenta proporcionalmente com a concentração de boro na amostra.

4.2.2 Teor de Carbono Orgânico

O teor de carbono orgânico (C_{org}) dos EPs foi determinado pelo método de oxidação com o dicromato de potássio, conforme Manual de Métodos de Análise de Solo da Embrapa (EMBRAPA, 2017), por via úmida. Neste método, a determinação do C_{org} ocorre indiretamente em função da reação do carbono com o dicromato de potássio, na presença de ácido sulfúrico concentrado e de uma fonte externa de calor, que são usados como energia catalisadora da reação de oxidação. O dicromato remanescente é quantificado por titulação com solução de sulfato ferroso amoniacal padronizada.

4.2.3 pH, condutividade elétrica, densidade, índice de refração (°Brix) e acidez

A medição do potencial hidrogeniônico, ou seja, a determinação da concentração de íons H^+ das amostras, foi realizada por meio de um potenciômetro com eletrodo combinado de vidro (pHmetro Digimed mod DM-22). O potenciômetro foi aferido e calibrado com soluções-padrão de pH 4,00 e pH 7,00.

A condutividade foi medida com o auxílio de um condutivímetro digital (Tecnal mod Tec-4MP). O aparelho foi ajustado com a temperatura da amostra e a leitura foi aferida com solução de KCl 0,01 mol L^{-1} (condutividade de 1,4 mS cm^{-1}). A célula de condutividade foi lavada com água duas a três vezes e seca antes das medidas. O índice salino foi calculado dividindo a condutividade da amostra pela condutividade do nitrato de sódio ($NaNO_3$).

Para determinação da densidade (massa específica) das amostras foi utilizado um picnômetro Gay-Lussac com capilar de 25 mL de capacidade. Inicialmente, verificou-se o volume do picnômetro. O picnômetro foi limpo, seco e pesado, com precisão de 0,1 mg. Em seguida, foi adicionada água destilada. O picnômetro foi imerso em banho de água termostatizado a $20 \pm 0,5^\circ C$ por 20 minutos. Após esse período, o picnômetro com água foi seco com papel absorvente e pesado. O mesmo procedimento foi repetido substituindo a água pela amostra, evitando a formação de bolhas de ar. Por fim, o volume foi calculado dividindo a diferença entre a massa do picnômetro com a água destilada e a massa do picnômetro vazio, em gramas, pela densidade da água tabelada a $20^\circ C$, enquanto a densidade da amostra foi calculada

dividindo a diferença entre a massa do picnômetro com a amostra e a massa do picnômetro vazio, em gramas, pelo volume calculado.

Foram determinados também os índices de refração ($^{\circ}\text{Brix}$) (OASMAA; KUOPPALA, 2008) dos EPs, utilizando o refratômetro da marca Hanna mod. HI96801.

A acidez foi determinada pelo método de titulação ácido-base, utilizando a fenolftaleína como indicador.

4.2.4 Teor de Ácidos húmicos e Fúlvicos

Os teores de ácidos húmicos (AH) e fúlvicos (AF) foram determinados conforme método volumétrico do dicromato de potássio descrito no Manual de Métodos Analíticos Oficiais para Fertilizante e Corretivos, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2017). O método consiste na extração do extrato húmico total (EHT) com solução alcalina, separação das frações AH e AF pela diferença de solubilidade em meio ácido (pH 1), sendo os AFs solúveis e os AHs insolúveis e quantificação das frações pela determinação do teor de carbono orgânico total por oxidação com o dicromato de potássio.

As amostras foram submetidas a extração alcalina com solução extratora de pirofosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para obtenção do EHT. Após adição da solução extratora nas alíquotas das amostras, agitou-se manualmente e deixou a mistura em repouso por 24 horas. Após esse período, a mistura foi centrifugada, o sobrenadante recolhido e reservado, e foi adicionada novamente a solução extratora até o desprendimento e suspensão do precipitado. A mistura foi deixada em repouso por 1 hora e centrifugada novamente por 15 minutos. O sobrenadante foi recolhido e reservado junto ao anterior, compondo a solução de EHT. Posteriormente, foi realizado o fracionamento do EHT em AH e AF. O pH do EHT foi ajustado a pH 1 com a adição de gotas de solução de H_2SO_4 20%, seguido de decantação por 18 horas e filtração com filtro de membrana de $0,45 \mu\text{m}$ sob vácuo. O filtrado foi recolhido e avolumado para 100 mL com água, compondo a fração de AF. Sobre o precipitado foi adicionado NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ até a lavagem completa do filtro. Para compor a fração de AH, o solubilizado foi recolhido em balão de 100 mL e avolumado com água. Por fim, os teores de carbono orgânico total das frações AH e AF foram quantificados por oxidação com o dicromato de potássio.

4.2.5 Teor de fenóis

O teor total de compostos fenólicos foi determinado pelo ensaio de Folin-Ciocalteu de acordo com o procedimento descrito por Rover e Brown (2013). O método é baseado na redução química do reagente de Folin-Ciocalteu (mistura de ácidos fosfotungstíco e fosfomolibdico) pela oxidação dos compostos fenólicos, produzindo óxido de tungstênio e óxido de molibdênio de cor azul que absorvem no comprimento de onda de 760 nm.

Foram adicionados 100 μL do reagente de Folin-Ciocalteu em 10 μL de amostra, seguida da adição de 150 μL de solução de carbonato de sódio 10% m/v. A mistura foi agitada durante 10 s e deixada à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após 2 horas, a absorbância foi determinada a 765 nm usando espectrofotômetro UV-vis. O ácido gálico foi usado para construir a curva analítica padrão. As soluções padrão de calibração do ácido gálico foram produzidas dissolvendo 0,5 g de ácido gálico em 10 mL de metanol e depois avolumadas para 100 mL com água (5 g L^{-1} final). Padrões com concentrações de 50, 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 mg L^{-1} foram preparados diluindo 10, 20, 40, 80, 120, 160, 200 μL da solução padrão em água até 1 mL, respectivamente.

4.2.6 Teor de açúcares

O conteúdo de açúcares foi determinado com base no método (AOAC) 988.12 (44.1.30), segundo Rover *et al.* (2013). Primeiramente 600 μL de ácido sulfúrico concentrado foram adicionados a 200 μL de amostra, juntamente com 120 μL de uma solução de 5% de fenol. A solução de fenol foi preparada pela dissolução de 5 g de fenol em 100 mL de água. A mistura foi aquecida por 5 min em um banho a 90 °C e resfriada por 5 min à temperatura ambiente. A absorbância foi medida a 490 nm em um espectrofotômetro. O levoglucosan foi utilizado como padrão para construção da curva de calibração. Uma solução estoque foi preparada dissolvendo 50 mg de levoglucosan seco em 50 mL de água deionizada (1000 mg L^{-1}). Os padrões para curva de calibração foram preparados diluindo 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120 μL da solução até 1 mL de água (10 mg L^{-1} ; 20 mg L^{-1} ; 40 mg L^{-1} ; 60 mg L^{-1} ; 80 mg L^{-1} ; 100 mg L^{-1}). Foi utilizado o fator de correção de 0,76% em peso proposto por Rover *et*

al. (2013) para reduzir ou eliminar a influência de interferentes presentes nas amostras como furfural, 2 (5H)-furanona, hidroximetilfurfural e álcool furfurílico (ROVER *et al.*, 2013).

4.2.7 Quantificação de aminoácido por CLAE

Para quantificação dos aminoácidos foram realizadas análises conforme White *et al* (1986) (WHITE; HART; FRY, 1986). Inicialmente foi realizada a hidrólise protéica da amostra com adição de uma solução de HCl 6 M/fenol 1%, a 106 °C por 24h. Posteriormente, o hidrolisado foi submetido a derivatização com fenilisotiocianato formando os derivados de feniltiocarbamil-aminoácidos. Em seguida, foi realizada a separação e quantificação dos produtos por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector de UV a 254 nm. Foram quantificados os aminoácidos: ácido aspártico, ácido glutâmico, serina, glicina, histidina, taurina, arginina, treonina, alanina, prolina, tirosina, valina, metionina, cistina, isoleucina, leucina, fenilalanina, lisina e hidroxiprolina. As análises foram realizadas em laboratório externo do Instituto Brasileiro de Análises (IBRA) e as condições cromatográficas não foram disponibilizadas.

4.2.8 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de massas (CG-EM)

4.2.8.1 Quantificação de HPAs

Para quantificação dos hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) as amostras foram preparadas conforme Método da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos U.S. EPA 3510C:1996 PAH/SVOC por extração líquido-líquido em funil de separação e posteriormente foram analisadas em Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas (CG-EM), conforme U.S.EPA 8270 D:2007. Foram quantificados os HPAs: benzo[*a*]pireno, benzo[*a*]antraceno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*k*]fluoranteno, benzo[*g,h,i*]perileno, criseno, dibenzo[*a,h*]antraceno, e indeno[1,2,3-*cd*]pireno, sugeridos pela Embrapa na Circular 177 (CAMPOS, 2018a) para o controle de qualidade do EP. As análises foram realizadas em laboratório externo ALS e as condições cromatográficas não foram disponibilizadas pelo laboratório por serem consideradas confidenciais.

4.2.8.2 Extração com éter metil-terc-butilico (MTBE)

Para a identificação dos principais compostos presentes nas quatro amostras de EP, foram realizadas análises de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) no Laboratório de Ensaio e Combustíveis da UFMG (LEC), com base na metodologia descrita por Banel e Zygmunt (2011). Anteriormente à extração com éter metil-terc-butilico (MTBE) foi adicionado 1 g de cloreto de sódio (NaCl) em amostras de 4 mL para reduzir a solubilidade dos compostos orgânicos em água e aumentar a recuperação. A extração foi realizada duas vezes com 2 mL de MTBE por 10 minutos em vórtex, seguida de centrifugação (2 min/4000 rpm). As fases orgânicas provenientes das duas extrações foram coletadas com o auxílio de uma seringa e combinadas. Foi adicionado sulfato de sódio anidro para remoção da água residual e posteriormente a amostra foi filtrada e em N₂, ressuspensa em 300 µL de MTBE e submetida a análise cromatográfica.

A separação cromatográfica foi conduzida em coluna analítica NA-WAX (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm), de acordo com o seguinte programa de temperatura: 2 minutos sob temperatura constante de 60 °C, seguido de aumento de 5 °C/min, e posterior estabilização em 220 °C por 16 minutos. O injetor operou no modo split na razão de separação 1:10 (mantendo a temperatura do injetor constante em 250 °C). Foi utilizado hélio como gás de arraste, sob fluxo de 0,7 mL min⁻¹ na coluna. A aquisição dos espectros foi obtida no intervalo de 40 – 400 *m/z*. A identificação dos componentes do extrato foi feita comparando os espectros com a base de dados da biblioteca NIST e Wiley.

4.2.8.3 Extração sequencial com diferentes solventes

O EP de eucalipto produzido em forno metálico (1.EPCE) foi submetido à extração sequencial com diferentes solventes [hexano, tolueno, clorofórmio, diclorometano, éter metil-terc-butilico (MTBE), butanol]. A amostra foi extraída sequencialmente 5 vezes com 5 mL do solvente orgânico e cada fração orgânica foi agrupada separadamente (seis frações, de acordo com o solvente orgânico utilizado), reunida e seca com sulfato de magnésio anidro. Após a filtração, o solvente foi evaporado e o resíduo ressuspensa em 5 mL do mesmo solvente

orgânico utilizado na etapa de extração para a análise CG-MS. As condições cromatográficas empregadas foram as mesmas descritas na seção anterior (4.2.8.2).

4.3 Avaliação do efeito do extrato pirolenhoso na inibição da atividade da enzima urease *in vitro*

A atividade de urease *in vitro* foi determinada através do método do indofenol no Laboratório do Grupo de Estudos em Química Orgânica e Biológica do Departamento de Química da UFMG (GEQOB) (WEATHERBURN, 1954). O método consiste na quantificação do íon amônio gerado a partir da hidrólise da ureia, catalisada ou não pela urease. A amônia reage com o hipoclorito de sódio (NaClO) e o fenol, na presença do catalisador nitroprussiato de sódio, para formar o indofenol que tem coloração azul. Esta reação é conhecida por reação de Berthelot e o mecanismo consiste em três etapas: (i) o hipoclorito de sódio atua como agente oxidante, oxidando a amônia e convertendo-a em um composto mais reativo chamado monocloramina (NH_2Cl), (ii) a monocloramina reage com um fenol para formar benzoquinona clorimina, (iii) a benzoquinona clorimina reage com um segundo fenol para formar um indofenol. A intensidade da cor formada é proporcional à concentração de amônia na amostra testada e a determinação é realizada por leitura espectrofotométrica.

As amostras de EP nas concentrações finais de 0,2; 0,4 ou 0,6%, bem como o controle negativo (etanol) e controle positivo (ácido aceto-hidroxiâmico, conhecido inibidor da urease) foram incubados juntamente com tampão fosfato 20 mM e ureia na concentração final de 10 mM, na presença ou ausência de urease tipo III de *Canavalia ensiformis*, em microplacas de 96 poços. As placas foram incubadas por 10 min a 600 rpm e 25 °C, em agitador de placa (Biosan Plate Thermo Shaker PST-60HL-4). Após a incubação, foram adicionadas a “solução A” (Fenol 1% m/v e Nitroprussiato de sódio - SNP 0,005% m/v) e a “solução B” (NaOH 0,5% m/v e NaOCl 0,1% m/v), na ausência de luz, uma vez que o nitroprussiato é fotossensível. Por fim, as placas foram novamente incubadas a 37 °C por 15 min a 600 rpm para realização de leitura espectrofotométrica a 630 nm. A quantidade de indofenol formado é proporcional à concentração de amônio no meio e inversamente proporcional à inibição enzimática. Como o EP consiste em uma mistura de centenas de compostos não é possível calcular sua concentração micromolar, sendo assim as dosagens foram calculadas em relação ao volume da mistura de ureia, urease, água, tampão e EDTA. O tampão fosfato tem como função suprimir a influência

do pH causada por pequenas variações no teor de ácido e o EDTA evitar a precipitação de hidróxidos e fosfatos.

Tabela 9. Quantidades dos compostos utilizada em cada poço de reação da microplaca.

Compostos/Enzima	Quantidade utilizada
EP diluído 2%, 4% ou 6% e padrões	10 μL
Base (Tampão, EDTA, água)	75 μL
Urease 2,5 U mL^{-1}	5 μL
Ureia 100 mM	10 μL
Total	100 μL

Alguns dos compostos apontados nas análises de CG-EM do EP (ácido acético; 1,2-benzenodiol; 3-metoxicatecol; 4-metilcatecol; hidroquinona; metil-hidroquinona; 4-etilresorcinol; aceto-hidrazina; ácido crotônico; hidroxiacetona; maltol; anidrido maleico; ácido 2,6-di-hidroxibenzóico; ácido acrílico; aminofenol; vanilina; siringaldeído; cicloteno; ácido levulínico; delta-valerolactona; fenol; 3-metil-2-ciclopentenona, 4-hidroxycumarina; levoglucoscan) e outros não encontrados, mas que apresentavam estruturas semelhantes (2-metoxi-hidroquinona; resorcinol; 2,4-di-hidroxibenzaldeído; 3,4-di-hidroxibenzaldeído; 3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzaldeído; pirogalol; 2,3,4-tri-hidroxibenzaldeído; floroglucinol; ácido gálico; ácido fumárico; 4-metoxiacetofenona; 2-dimetil-aminofenol; o-fenilenodiamina; linoleato de metila) também foram avaliados quanto a capacidade de inibir a urease *in vitro* através deste ensaio.

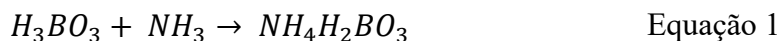
4.4 Modelagem Molecular dos principais compostos inibidores identificados no EP

A estrutura cristalina da urease foi extraída do banco de dados Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB, <https://www.rcsb.org/>) (BERNSTEIN *et al.*, 1977), sob o código 5G4H (MAZZEI, Luca *et al.*, 2017b). Os compostos pirocatecol (PC) e 4-metilcatecol (MC) foram construídos usando o software MarvinSketch® (CSIZMADIA, 1999) e submetidos à otimização geométrica pelo método semi-empírico AM1 (Austin Model 1), usando o software ArgusLab® (ODA *et al.*, 2007). O docking molecular foi realizado usando o software GOLD® (VERDONK *et al.*, 2003). Inicialmente, foi realizado o re-docking do ligante cocrystalizado em uma região de 5 Å ao redor do ligante, utilizando os

algoritmos ChemPLP, GoldScore, ChemScore e Astex Statistical Potential - ASP, e a distância da raiz média quadrática (DRMS), ou seja, foi calculada usando o software PyMol® (LILL; DANIELSON, 2011). Para ambos os ligantes, as poses de ligação de menor energia (usando a função ChemPLP score) foram escolhidas como as conformações iniciais para as simulações MD dos complexos proteína-ligando para 100 ns (BRAGA *et al.*, 2019; SANTOS NASCIMENTO; AQUINO; SILVA-JÚNIOR, 2022) usando o GROMACS® (BERENDSEN; VAN DER SPOEL; VAN DRUNEN, 1995). Finalmente, as figuras de interação 3D foram geradas usando o software Chimera® (GODDARD; HUANG; FERRIN, 2005), diagramas de interações 2D usando o software Discovery Studio® (WANG, Qing *et al.*, 2015) e DRMS de proteína (GRACE HOME, [s. d.]) o software Xmgrace® (GRACE HOME, [s. d.]).

4.5 Avaliação da inibição da urease em sistema fechado com fluxo de ar contínuo

A volatilização da amônia no solo foi avaliada conforme o método descrito por Guimarães *et al.* (2015) com modificações. O método consiste na aplicação de ureia, com e sem inibidores, sobre 100 g de solo e avaliação da volatilização da amônia. O sistema (Figura 6) é constituído de câmaras de incubação com fluxo contínuo de ar comprimido, conectadas a unidades coletoras de amônia (erlenmeyers com 40 mL de solução de ácido bórico 20 g L⁻¹; pH = 5,04) (GUIMARÃES *et al.*, 2015). Uma pressão de ar contínua de 15 psi foi usada para cada unidade de incubação. O ar utilizado era isento de amônia, sendo bombeado por um compressor que transportava o ar através de um conjunto de filtros, acoplado a um vaso de pressão (Millipore; XX6700P05), para permitir o controle adequado do fluxo de ar e a renovação da atmosfera nas câmaras. O fluxo utilizado foi de 0,3 L min⁻¹. A amônia gerada pela hidrólise da ureia é carregada pelo fluxo de ar e borbulhado na solução de ácido bórico. A amônia reage com o ácido bórico (conforme Equação 1), promovendo o aumento do pH.



Um dia antes do início do experimento, cada câmara de incubação recebeu uma amostra de 100 g de solo do tipo Argissolo Vermelho-Amarelo, coletado em área de pastagem existente no município de Viçosa, Minas Gerais (latitude 20.7609° S e longitude 42.8693° W), previamente seco ao ar e peneirado (malha de 2 mm). As amostras de solo coletadas na camada

de 0 a 20 cm de profundidade, foram caracterizadas quanto aos atributos físicos e químicos e continham: 58% de areia, 6% de silte, 36% de argila, $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})}$ 5,8, $\text{P}_{\text{Mehlich}}$ 5,3 mg dm^{-3} , $\text{K}_{\text{Mehlich}}$ 198,0 mg dm^{-3} , Ca 3,4 cmolc dm^{-3} , Mg 1,9 cmolc dm^{-3} , Al ausente, $\text{H}^+ \text{Al}$ 4,7 cmolc dm^{-3} , 56% saturação de bases e matéria orgânica equivalente a 6,4 dag kg^{-1} . A umidade do solo foi elevada a 80% da umidade equivalente com água destilada e as câmaras foram mantidas em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). A ureia (com e sem aditivo) foi aplicada ao solo, na forma de solução, em quantidade suficiente para fornecer 0,1 g de nitrogênio. Imediatamente após a adição dos tratamentos, as câmaras foram seladas e o fluxo de ar foi iniciado. As avaliações foram realizadas 24, 48, 72, 96, 120 e 144 h após o início do fluxo, para quantificação da amônia volatilizada. A cada avaliação, as unidades coletoras eram substituídas por outras e a amônia era quantificada por titulação potenciométrica (Tritino Plus 840) com ácido clorídrico (0,05 mol L^{-1}). O experimento foi realizado em quadruplicata. Os resultados foram expressos em miligramas de N volatilizado por grama de N aplicado, avaliados nos respectivos tempos, que correspondem à taxa de perda de N ou taxa de volatilização, e pelo percentual acumulado de perda de N.

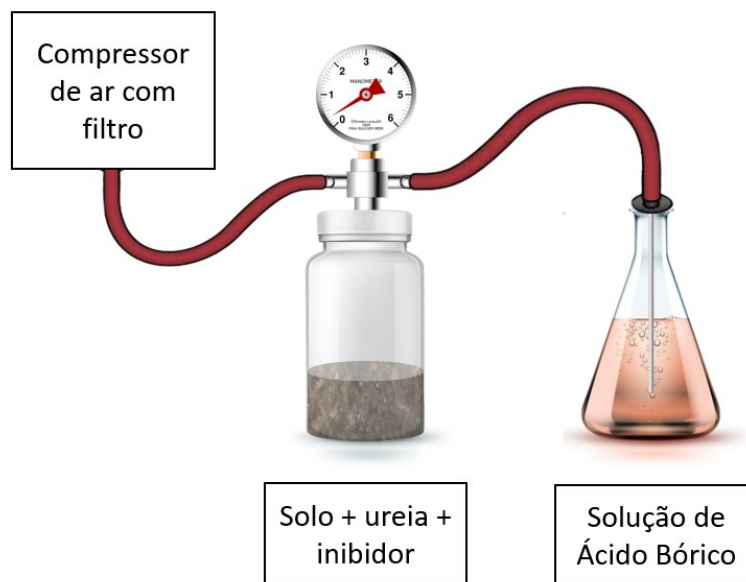


Figura 6: Esquema do sistema para avaliação da inibição da urease no solo.

O teste de volatilização de amônia em sistema fechado com fluxo de ar contínuo foi utilizado para avaliar as substâncias pirocatecol (PC) e 4-metilcatecol (MC); e os extratos 1.EPCE e 2.EPAE. O tratamento contendo NBPT (*N*-(*n*-butil) tiofosfórico triamida - 0,08%

(p/p) em relação à ureia, concentração utilizada na formulação comercial Agrotain Ultra®) foi utilizado como controle positivo e ureia sem aditivos como controle negativo. Os extratos foram aplicados na proporção de 0,005% em relação à quantidade de solo em cada unidade experimental e o PC e MC foram aplicados na mesma concentração molar do NBPT.

Os resultados foram representados como média $\pm$ desvio padrão da média. A normalidade foi avaliada pelo teste D'Agostino-Pearson. A homocedasticidade foi avaliada pelo teste de Brown-Forsythe. Para a análise dos tratamentos foi utilizado o teste One-way ANOVA com pós-teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. As análises foram realizadas com o software GraphPad Prism® 9.0.2.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterizações físico-químicas

A caracterização físico-química das amostras de EP avaliadas no presente trabalho está apresentada na Tabela 10. O pH das amostras variou em torno de 3 a 3,8, em concordância com outros trabalhos da literatura (MATHEW; ZAKARIA, 2015; THEAPPARAT, Y.; CHANDUMPAI; FAROONGSARNG, 2018). Segundo Theapparat Y. *et al* (2018), o pH dos EPs, em geral, varia de 2 a 4, devido à presença de ácidos orgânicos, como ácido acético, ácido fórmico e ácido propanoico (THEAPPARAT, Y.; CHANDUMPAI; FAROONGSARNG, 2018). Ademais, a quantidade desses compostos, e consequentemente o pH, oscilam em função da biomassa, do tipo de forno, da temperatura de carbonização, entre outros fatores (THEAPPARAT, Y. *et al.*, 2014; THEAPPARAT, Y.; CHANDUMPAI; FAROONGSARNG, 2018). De acordo com Theapparat *et al.* (2014), os critérios para julgar a qualidade dos EPs foram sugeridos por Wada (1997) como: pH em torno de 3; densidade em torno de 1,010–1,050 g mL⁻¹; coloração amarelo pálido ou marrom avermelhado; odor de defumado; visualmente transparente sem matéria suspensa; e o teor de alcatrão dissolvido não superior a 3% (THEAPPARAT, Y. *et al.*, 2014).

As amostras apresentavam coloração marrom avermelhada, sendo que a amostra 1.EPCE apresentava um tom mais escuro. A coloração mais escura da amostra 1.EPCE pode estar relacionada ao maior teor de ácido húmicos e fúlvicos dessa amostra. Observou-se também que com a oxigenação e exposição à luz as amostras tendiam a se tornar mais escuras.

Tabela 10. Caracterização físico-química das amostras de extrato pirolenhoso.

Parâmetros	1.EPCE	2.EPAE	3.EPCC	4.EPAN
Índice de Refração (°Brix)	17,1	3,4	10	6
Densidade (g cm ⁻³)	1,04	1,01	1,01	1,01
pH	3	3,8	3,1	3,8
Condutividade Elétrica (mS cm ⁻¹)	25	11	17	14
Índice Salino	2,25	0,99	1,64	1,35
Carbono orgânico (%)	9,77	3,47	7,8	5,43
Nitrogênio (%)	0,33	0,27	0,37	0,33
Relação C/N	30	13	21	16
Fósforo (%)	0,03	0	0	0,03
Potássio (mg L ⁻¹)	142,88	0	0	0
Cálcio (mg L ⁻¹)	30,64	0	0	0
Magnésio (mg L ⁻¹)	67,94	< 0,0013	< 0,0013	< 0,0013
Enxofre (%)	0,01	0	0	0,01
Sódio (mg L ⁻¹)	34,1	2,87	8,84	12,6
Boro (%)	0	0,04	0,11	0
Cobre (mg L ⁻¹)	0	0	0	0
Ferro (mg L ⁻¹)	0,12	0,23	71,79	0,24
Manganês (mg L ⁻¹)	< 0,0013	< 0,0013	< 0,0013	< 0,0013
Zinco (mg L ⁻¹)	0	16,19	0	218,88
Alumínio (mg L ⁻¹)	43,69	43,69	0	124,55
Cobalto (mg L ⁻¹)	20,87	22,62	< 0,0004	< 0,0004
Molibdênio (mg L ⁻¹)	28,78	28,78	0	0
Ácido Húmico (%)	3,83	0,95	1,84	1,4
Ácido Fúlvico (%)	14,94	1,54	2,47	2,68
Glicina (%)	0,02	0,02	<0,01	<0,01
Histidina (%)	0,08	0,08	<0,01	<0,01
Fenóis Totais (% eq. ácido gálico)	1,15±0,06	0,40±0,01	0,961±0,003	0,73±0,03
Açúcares (% eq. levoglucosan)	3,43±0,19	0,83±0,08	1,22±0,12	0,63±0,08
Acidez (% eq. Ácido acético)	7,96	2,84	8,34	5,12

Nota: 1.EPCE: Extrato Pirolenhoso de Eucalipto produzido no Forno Container; 2.EPAE: Extrato Pirolenhoso de Eucalipto produzido em forno de alvenaria; 3.EPCC Extrato Pirolenhoso de Casca de Coco produzido em forno metálico; 4.EPAN: Extrato Pirolenhoso de Acácia Negra produzido em forno de alvenaria.

As concentrações de macronutrientes na planta variam de 30 a 60.000 mmol/kg de massa seca, enquanto as de micronutrientes variam de 0,001 a 3 mmol/kg de massa seca (PAULILO; VIANA; RANDI, 2015). O molibdênio, encontrado apenas nas amostras de eucalipto (1.EPCE e 2.EPAE), é o micronutriente requerido em mais baixa quantidade pelas plantas (0,1 ppm de matéria seca) (EPSTEIN, 1972) e está relacionado com o metabolismo do nitrogênio (PAULILO; VIANA; RANDI, 2015). Este micronutriente está presente na enzima nitrato redutase que catalisa a redução do nitrato a nitrito, primeiro passo do processo de assimilação do nitrogênio do nitrato em aminoácidos e é encontrado na nitrogenase, responsável pela fixação biológica do N₂ pelos microrganismos (FAQUIN, 2005).

O zinco apresentou maior concentração na amostra de acácia negra (4.EPAN), embora também tenha sido encontrado na amostra 2.EPAE. Junto ao boro, o Zn é o micronutriente que com maior frequência tende a causar deficiências em culturas cultivadas em solos de regiões tropicais (FAQUIN, 2005) e sua concentração nas plantas é em torno 20 ppm de matéria seca (EPSTEIN, 1972). O Zn é componente ativador de várias enzimas, incluindo desidrogenases (alcoólica, glutâmica e láctica), sintetases, carboxilases, isomerases (FAQUIN, 2005). Além disso, existem evidências que indicam a participação do zinco na síntese do triptofano, precursor dos hormônios da classe das auxinas (FAQUIN, 2005; PAULILO; VIANA; RANDI, 2015).

O ferro foi encontrado em concentrações mais altas na amostra de casca de coco (3.EPCC) em relação as demais. O Fe é parte do grupo catalítico de muitas enzimas que participam em reações da fotossíntese, fixação do nitrogênio e respiração (PAULILO; VIANA; RANDI, 2015). Sua concentração média nas plantas é em torno de 100 ppm de matéria seca (EPSTEIN, 1972).

O Brix é uma escala numérica utilizada para soluções de sacarose, na qual um °Brix igual a 10 equivale a, aproximadamente, 10 gramas de sacarose em 100 mL de solução. Segundo Oasmaa e Kuoppala (2008), quando se analisa o índice de refração (°Brix) da fase aquosa dos líquidos de pirólise, quantifica-se o total de açúcares (aldoses e cetoses) juntamente com a fração de hidroxí-aldeídos e hidroxí-cetonas, cujas estruturas químicas são semelhantes (OASMAA; KUOPPALA, 2008). Ainda de acordo Oasmaa e Kuoppala (2008), grande parte desses carboidratos é insolúvel em éster em geral e não é eluída nas análises de CG-EM. Observa-se que as amostras apresentaram diferentes teores de Brix, sendo a 2.EPAE com a menor concentração (3,4 gramas em 100 mL) e a 1.EPCE com a mais alta concentração, equivalente a 17,1 gramas em 100 mL, o que pode ser devido ao processo de produção empregado, uma vez que ambas foram produzidas com a mesma biomassa.

No presente trabalho também foi utilizada a metodologia proposta por Rover *et al.* (2013) para quantificação do teor de açúcar. De acordo com o autor, o teor total de açúcares solúveis nos líquidos de pirólise detectado por este método é comparável à determinação de açúcares por hidrólise com quantificação por CLAE. O método se baseia na reação de desidratação dos açúcares em meio fortemente ácido, sob aquecimento, que leva a formação de derivados furanos como o furfural. Esses produtos, então, condensam entre si e com outros produtos para produzir substâncias escuras, marrons e pretas (BEMILLER, 2010). O furfural é

incolor a amarelado, mas adquire coloração de marrom quando exposto a luz e ao oxigênio (CARY; DOBSON; GREGG, 2000). Os interferentes (furfural, 2-(5H)-furanona, hidroximetilfurfural e álcool furfurílico) deste método são descontados utilizando um fator de correção de 0,76% em peso proposto por Rover *et al.* (2013). O teor de açúcar quantificado conforme esta metodologia foi muito inferior ao Brix, confirmando a quantificação pelo índice de refração de outros compostos, além do açúcar, conforme exposto por Oasmaa e Kuoppala (2008).

Uma preocupação que se tem em relação à qualidade do EP está relacionada a presença de HPAs. Em nenhuma das amostras estudadas foram identificados os HPAs benzo[a]pireno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[g,h,i]perileno, criseno, dibenzo[a,h]antraceno, e indeno[1,2,3-cd]pireno, sugeridos pela Embrapa na Circular 177 para o controle de qualidade do extrato pirolenhoso.

5.1.1 Aminoácidos

Neste trabalho foram quantificados os aminoácidos: ácido aspártico, ácido glutâmico, serina, glicina, histidina, taurina, arginina, treonina, alanina, prolina, tirosina, valina, metionina, cistina, isoleucina, leucina, fenilalanina, lisina e hidroxiprolina, para as quatro amostras de EP. Entretanto, apenas as amostras de eucalipto (1.EPCE e 2.EPAE) apresentaram teores de glicina e histidina quantificáveis pela metodologia utilizada (Tabela 10). Os demais aminoácidos avaliados apresentaram teores abaixo do limite de quantificação do método que foi de 0,01%. A glicina, encontrada nas amostras de EP de eucalipto, tem sido destacada como um importante aminoácido para agricultura capaz de promover maior absorção e translocação de nutrientes pelas plantas, devido a sua capacidade quelante (NOROOZLO; SOURI; DELSHAD, 2019; SOURI; HATAMIAN, 2019). A histidina é um dos aminoácidos padrão nas proteínas e desempenha um papel fundamental no crescimento e desenvolvimento das plantas (INGLE, 2011).

Embora os aminoácidos sejam uma fonte importante de nitrogênio para algumas culturas, baixos teores, como os encontrados nas amostras de EP, apresentam apenas função bioestimulante, tendo em vista que as quantidades são muito pequenas para que os efeitos benéficos sejam atribuídos ao aumento da disponibilidade de N.

Schiavon *et al.* (2008) demonstraram os efeitos bioestimulantes dos aminoácidos derivados de um hidrolisado de proteínas de alfafa. O hidrolisado apresentava um teor de nitrogênio total, pelo método Kjeldahl, igual a 2,28% e um conteúdo total de aminoácidos livres igual a 1,9%. Aplicado a taxas de 0,01 e 0,1 mg L⁻¹, o hidrolisado resultou em maior crescimento da planta e acúmulo de açúcar nas folhas. Adicionalmente, a atividade de uma série de enzimas envolvidas no metabolismo do carbono (C) (malato desidrogenase, isocitrato desidrogenase e citrato sintase) e na redução e assimilação de N (nitrato redutase, nitrito redutase, glutamina sintetase, glutamato sintase, aspartato aminotransferase) foi significativamente induzida pelo fornecimento do hidrolisado às plantas (SCHIAVON; ERTANI; NARDI, 2008). Tendo em vista que as taxas normalmente aplicadas do EP na agricultura estão em torno de 1 a 10 mL por litro de calda agrícola, os teores de aminoácidos estariam em concentrações aproximadas ao hidrolisado avaliado por Schiavon *et al.* (2008) como bioestimulante.

A presença dos aminoácidos glicina (envolvido na quelação de minerais, melhorando a absorção destes) (NOROOZLO; SOURI; DELSHAD, 2019; SOURI; HATAMIAN, 2019) e histidina (com importante envolvimento na fotossíntese) (ONIDAS *et al.*, 2010) podem contribuir com o efeito bioestimulante do EP.

5.1.2 Ácidos húmicos e fúlvicos

Todas as amostras de EP (1.EPCE, 2.EPAE, 3.EPCC e 4.EPAN) apresentaram maiores teores de ácidos fúlvicos (AF) em relação aos ácidos húmicos (AH) (Tabela 10). Os AFs possuem menor ocorrência de unidade aromáticas, apresentam maiores teores de oxigênio e menores teores de carbono em relação aos AH (STANKOVIKJ *et al.*, 2017). A amostra 2.EPAE foi a que apresentou menores teores de AH e AF. Os teores de AF das amostras 3.EPCC e 4.EPAN foram semelhantes, uma vez que a diferença entre elas está dentro do coeficiente de variação médio da análise (<15%) (BENITES; MADARI; LUIZ DE A MACHADO, 2003).

Tradicionalmente, as substâncias húmicas, que desempenham um papel importante na fertilidade e porosidade do solo, são produzidas a partir de resíduos orgânicos frescos após processos de decomposição prolongados no solo. Embora muito benéfico, o efeito da utilização dos resíduos orgânicos fresco como, por exemplo, esterco e resíduos de colheitas, é lento. Além do longo período requerido, outra desvantagem está relacionada às elevadas quantidades

necessárias (50 a 200 t ha⁻¹). Adicionalmente, alguns dos resíduos, como os de origem animal, podem ainda ser fontes de poluentes e microrganismos prejudiciais (PICCOLO; PIETRAMELLARA; MBAGWU, 1997).

Stankovikj *et al.* (2017) propuseram uma estrutura representativa para as substâncias húmicas pirolíticas presentes nos líquidos de pirólise como o EP. Essas substâncias húmicas consistem em um grupo de moléculas com uma grande variedade de pesos moleculares, nas quais são encontradas unidades fenólicas, carboxílicas, carbonílicas e açúcares em estruturas altamente interligadas (Figura 7) (STANKOVIKJ *et al.*, 2017).

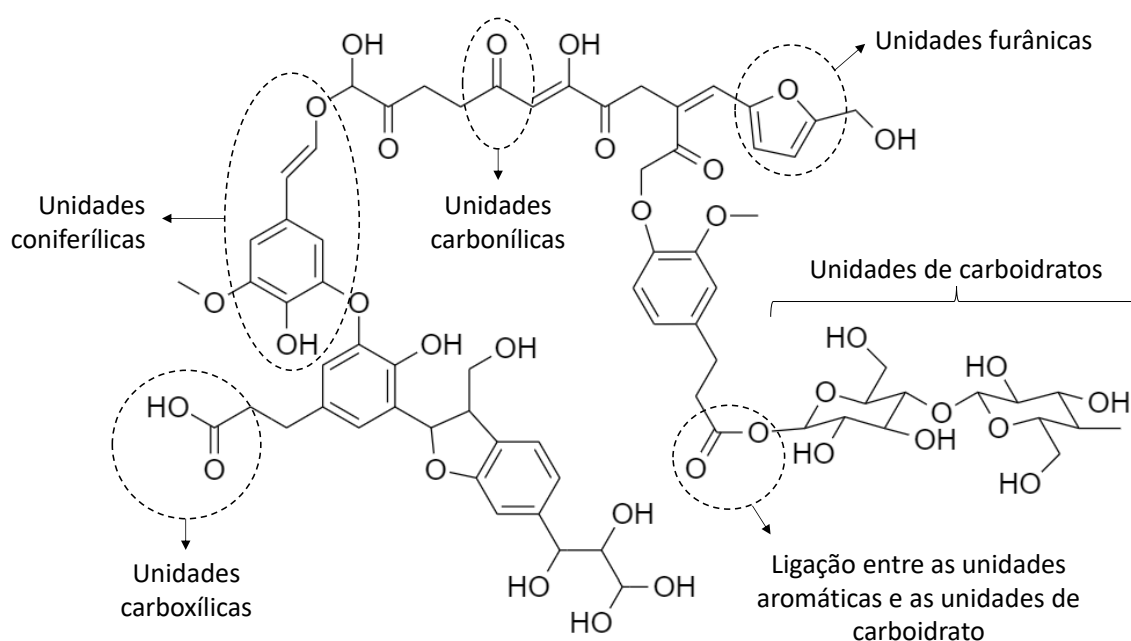


Figura 7: Representação esquemática para substância húmica pirolítica proposta por Stankovikj *et al.* (2017).

De acordo com Piccolo *et al.* (1997) as substâncias húmicas são capazes de formar complexos argilo-húmicos com componentes hidrofílicos orientados para o centro do agregado e componentes hidrofóbicos voltados para fora. Tais complexos aumentam a estabilidade do agregado, tornando o solo mais aerado, facilitando a penetração das raízes, aumentando a disponibilidade de água para as plantas, reduzindo a erosão do solo e protegendo os solos dos efeitos desagregadores de agroquímicos aniônicos aplicados aos solos agrícolas (PICCOLO; PIETRAMELLARA; MBAGWU, 1997). Estas observações estão em concordância com os resultados apresentados por Uthayakumar *et al.* (2011) que mostraram que a aplicação do EP

aumentou a porosidade, além de aumentar o teor de carbono do solo e solubilizar carbonatos indesejados (UTHAYAKUMAR; PRABAKAR; AZIS, 2011).

Outro benefício atribuído às substâncias húmicas está relacionado à sua atividade semelhante à auxina que estimula a H^+ -ATPase das membranas plasmáticas e promove o crescimento celular (HALPERN *et al.*, 2015). Zandonadi *et al.* (2010) mostraram que os ácidos húmicos se comportam como auxinas exógenas, estimulando a emergência de raízes laterais. Adicionalmente, os autores demonstraram que tais efeitos no desenvolvimento radicular envolvem a sinalização do óxido nítrico (NO). Isso porque, na presença de moléculas sequestrantes de NO, a estimulação da atividade da H^+ -ATPase e os efeitos no aumento das raízes laterais promovidos pelos ácidos húmicos são significativamente reduzidos (ZANDONADI *et al.*, 2010). A expressão e atividade da H^+ -ATPase das membranas plasmáticas, leva a acidificação do apoplasto, que não apenas estimula o crescimento, como também está envolvida em muitas respostas fisiológicas das plantas (ZANDONADI *et al.*, 2010). O aumento das raízes e dos teores de óxido nítrico também foi reportado por Zhong *et al.* (2020) na soja tratada com EP.

5.2 Principais compostos extraídos com MTBE identificados por cromatografia

No total foram identificados 121 compostos diferentes, sendo que 38 eram comuns a todas as quatro amostras (ANEXO I), independente da biomassa ou do forno utilizado na produção. Comparando os perfis cromatográficos (Figura 8), percebemos que as amostras de eucalipto (2.EPAE) e de acácia negra (4.EPAN), produzidas em fornos de alvenaria (fornos tradicionalmente usados na produção de carvão vegetal), apresentam um perfil semelhante e com menor intensidade de picos em relação às amostras de eucalipto (1.EPCE) e de casca de coco (3.EPCC) produzidas em forno metálico piloto.

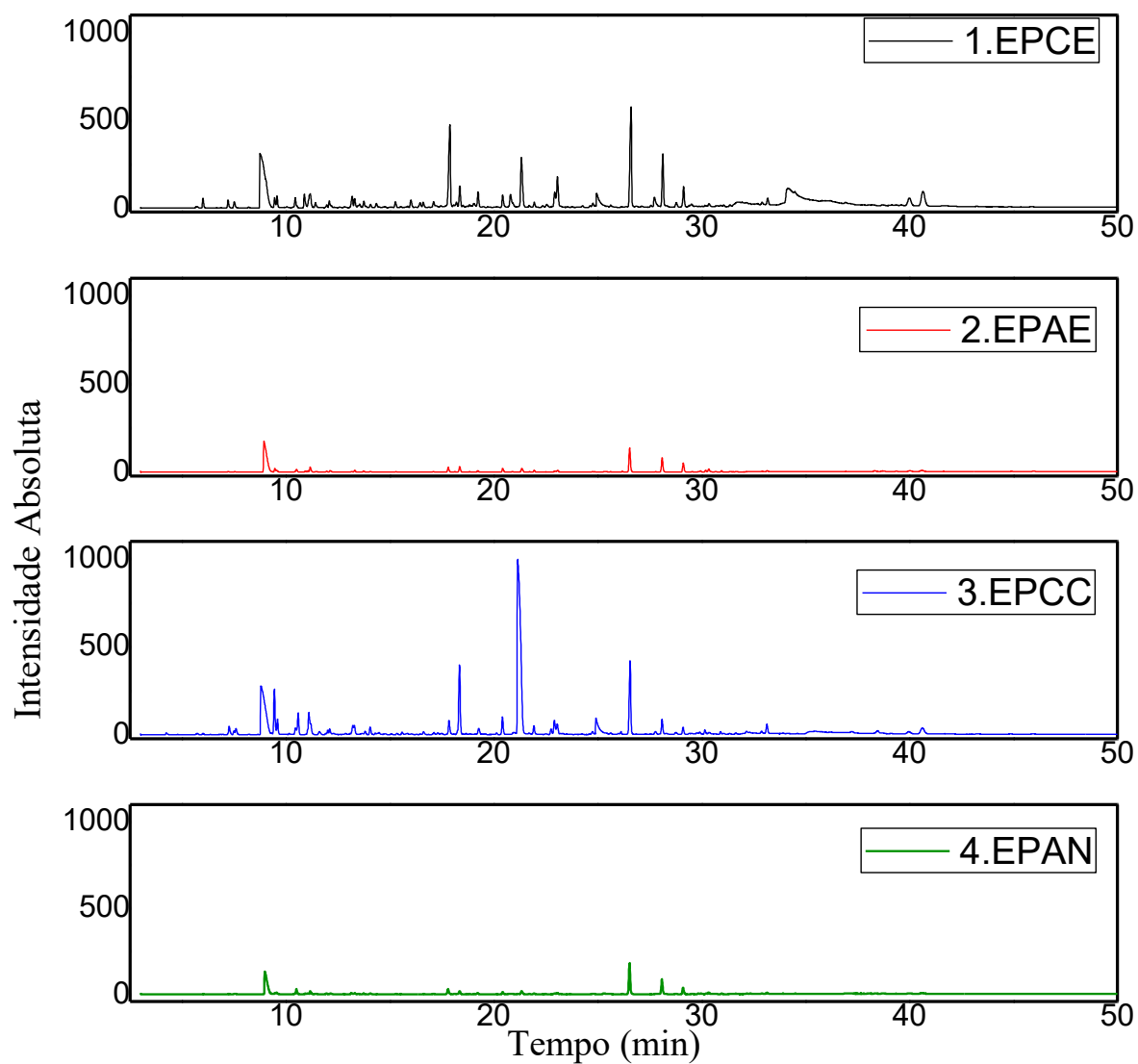


Figura 8: Comparação dos perfis cromatográficos de CG-EM das amostras de extrato pirolenhoso extraídas com MTBE. Condições cromatográficas: Coluna analítica NA-WAX (30 m × 0,25 mm, 0,25 μ m), Programa de temperatura: 2 minutos a 60 °C, rampa de 5 °C/min, e estabilização a 220 °C por 16 minutos. Injetor em modo split 1:10, a 250 °C. Gás de arraste: Hélio (0,7 mL min⁻¹).

O perfil cromatográfico semelhante das amostras 2.EPAE e 4.EPAN provavelmente se deve aos fatos de terem sido produzidas no mesmo tipo de forno (alvenaria) e pelo fato de tanto o eucalipto quanto a acácia negra serem madeiras duras e apresentarem lignina do tipo guaiacila-siringila, com predomínio das unidades siringila (LUPOI *et al.*, 2014; RAMADEVI *et al.*, 2016). Por outro lado, a casca de coco apresenta lignina do tipo *p*-hidroxifenila-guaiacila-siringila (RENCORET *et al.*, 2013) com predomínio das unidades guaiacila. Devido a essa diferença do tipo de lignina, o teor de siringol e seus derivados (metil, etil e propil) apresentam uma maior intensidade relativa nas amostras 2.EPAE e 4.EPAN, em relação à amostra 3.EPCC. O perfil cromatográfico de compostos voláteis do 3.EPCC no presente trabalho foi semelhante ao reportado por Said *et al.* (2015) para a pirólise da casca de coco acoplada a espectrometria de massas (Py-CG-EM) (SAID *et al.*, 2015).

Compostos como o cicloteno, cresol, acetol, pirocatecol, maltol, ácido 2-butenóico e os derivados de siringol foram encontrados em concentrações muito superiores na amostra 1.EPCE em relação as demais. Esta amostra também se destacou pelos elevados teores de Brix, de ácidos fúlvicos e ácidos húmicos (Tabela 10). Tanto a amostra 1.EPCE, quanto a 3.EPCC apresentaram teores individuais de ácido propanoico, ácido butanoico e ácido pentanoico 8 vezes superiores às amostras produzidas nos fornos de alvenaria (valores calculados a partir da área absoluta desses compostos nos cromatogramas Figura 9 e Figura 10).

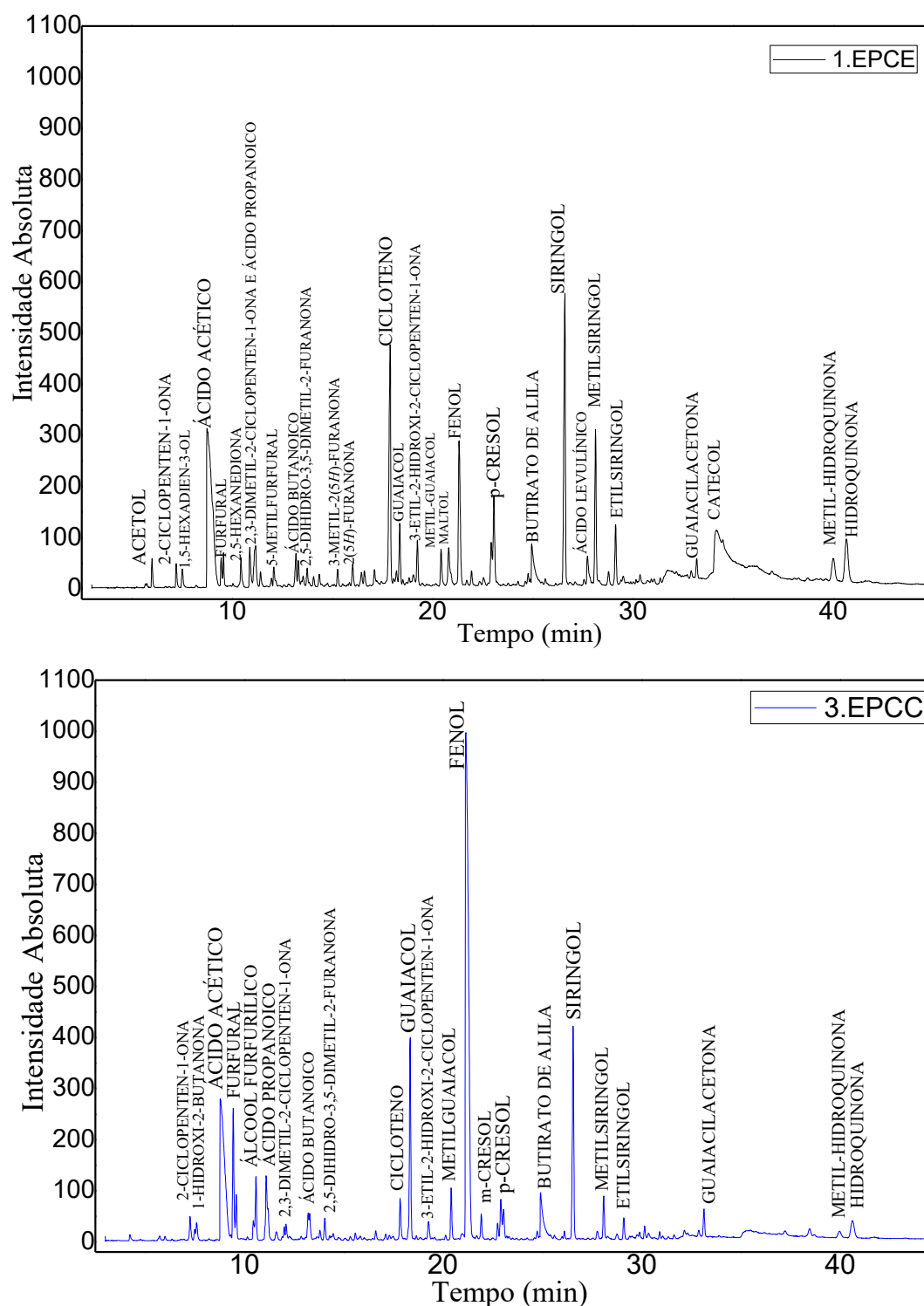


Figura 9: Cromatogramas de CG-EM com a identificação dos principais picos das amostras de EP extraídas com MTBE: a) de Eucalipto produzido no Forno Container b) de Casca de Coco produzido no Forno Metálico Piloto. Condições cromatográficas: Coluna analítica NA-WAX (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm), Programa de temperatura: 2 minutos a 60 °C, rampa de 5 °C/min, e estabilização a 220 °C por 16 minutos. Injetor em modo split 1:10, a 250 °C. Gás de arraste: Hélio (0,7 mL min⁻¹).

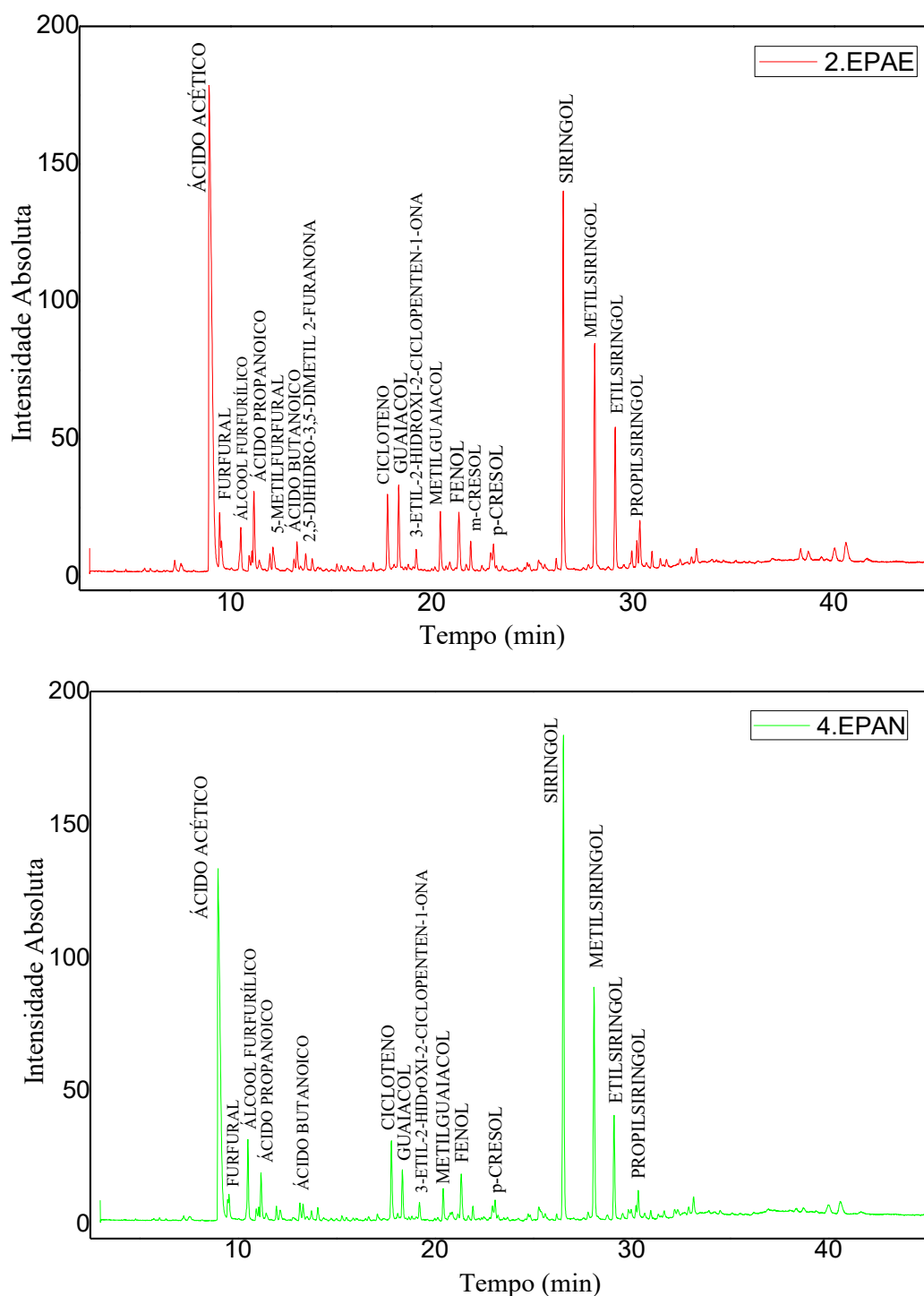


Figura 10: Cromatogramas de CG-EM com a identificação dos principais picos das amostras de EP extraídas com MTBE: a) de Eucalipto produzido no Forno de alvenaria b) de Acácia Negra produzido no Forno de alvenaria. Condições cromatográficas: Coluna analítica NA-WAX (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm), Programa de temperatura: 2 minutos a 60 °C, rampa de 5 °C/min, e estabilização a 220 °C por 16 minutos. Injetor em modo split 1:10, a 250 °C. Gás de arraste: Hélio (0,7 mL min⁻¹).

Em todas as amostras, foram observados compostos com diferentes funções orgânicas, como fenóis, ácidos carboxílicos, cetonas, ésteres, éteres e outros. No entanto, é importante ressaltar que a metodologia de análise por CG-EM aplicada não permite uma identificação definitiva dos compostos, mas sim a proposição de compostos por similaridade com os espectros da biblioteca do equipamento. Dentre os grupos encontrados, os ácidos e os fenóis se destacaram como os mais proeminentes (Figura 11). A variedade de compostos presentes no EP, conferem a ele diversas funcionalidades para uso na agricultura, conforme destacado na Tabela 11.

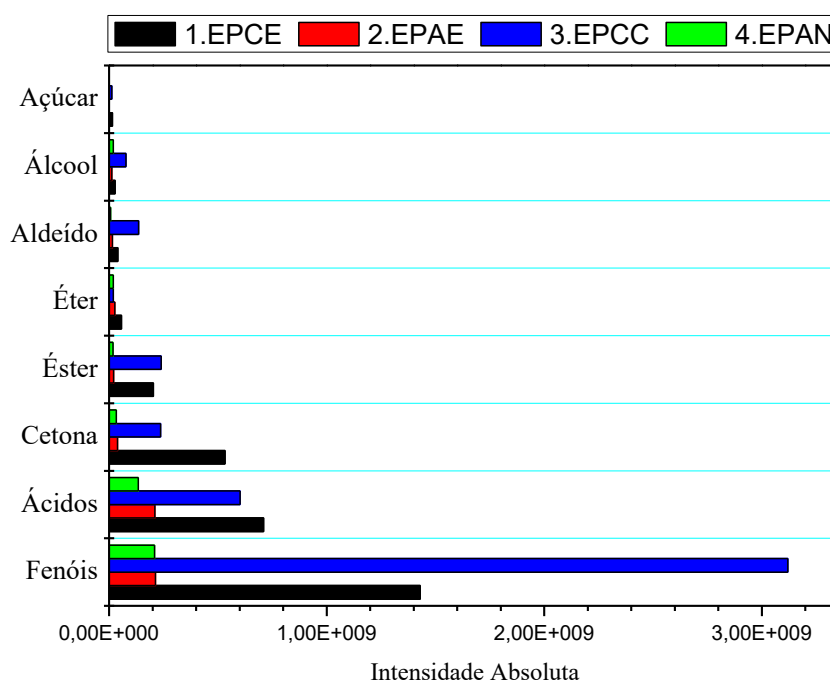


Figura 11: Comparação dos principais grupos de substâncias presentes nas amostras de extrato pirolenhoso propostas através das análises de GC-EM.

Tabela 11. Alguns compostos identificados nas análises cromatográficas, com seus respectivos tempos de retenção, área absoluta em cada amostra e atividade/propriedade reportada na literatura.

Tempo de retenção	Composto	Área absoluta				Atividade/Propriedade*	Ref.
		1.EPCE	2.EPAE	3.EPCC	4.EPAN		
5,730	Acetoína	2,9 x 10 ⁶	0,3 x 10 ⁶	5,7 x 10 ⁶	0,2 x 10 ⁶	-Promove crescimento -Indução de resistência sistêmica	(RYU <i>et al.</i> , 2003) (RYU <i>et al.</i> , 2004) (ABOUZIENA <i>et al.</i> , 2009)
8,748	Ácido Acético	5,5 x 10 ⁸	1,8 x 10 ⁸	4,3 x 10 ⁸	1,2 x 10 ⁸	-Herbicida -Conservante para frutas pós-colheita -Fungicida contra fungos do solo e doença da podridão radicular - Solubilização de nutrientes e aumento da biodisponibilidade -Termicida -Repelente	(VENDITTI <i>et al.</i> , 2008) (ABD-EL-KAREEM, 2009) (BAZIRAMAKENGA; SIMARD, 1998) (YATAGAI <i>et al.</i> , 2002) (HAGNER, M. <i>et al.</i> , 2015) (NTALLI <i>et al.</i> , 2010)
9,451	Furfural	0,22 x 10 ⁸	0,08 x 10 ⁸	1,1 x 10 ⁸	0,02 x 10 ⁸	-Nematicida -Fungicida -Repelente	(EL-MOUGY, Nehal S. <i>et al.</i> , 2008) (HAGNER, M. <i>et al.</i> , 2015)
11,099	Ácido propanoico	6,8 x 10 ⁷	1,4x 10 ⁷	7,0 x 10 ⁷	0,8 x 10 ⁷	-Termicida -Fungicida	(YATAGAI <i>et al.</i> , 2002)

							(EL-MOUGY, N S; ABDEL-KADER, 2009)
14,388	2-Hidroxi-benzaldeído (salicilaldeído)	-	-	2,7 x 10 ⁶	-	- Fungicida	(ZABKA; PAVELA, 2013)
							(LI, Zhanchao <i>et al.</i> , 2019; ZABKA; PAVELA, 2013)
18,349	2-Metoxifenol (guaiacol)	0,54 x 10 ⁸	0,13 x 10 ⁸	2,0 x 10 ⁸	0,09 x 10 ⁸	-Antioxidante - Fungicida	(ZABKA; PAVELA, 2013)
							(ALI; VENUGOPALAN, 2019)
20,791	Maltol	5,9 x 10 ⁷	-	1,0 x 10 ⁷	0,2 x 10 ⁷	-Larvacida -Intensificador de sabor e antioxidante	(GUO <i>et al.</i> , 2018; THEAPPARAT, Yongyuth; CHANDUMPAL; FAROONGSARNG, 2018)
20,414	2-Metoxi-4-metilfenol (4-metilguaiacol)	3,6 x 10 ⁷	1,0 x 10 ⁷	4,5 x 10 ⁷	0,6 x 10 ⁷	-Anti-inflamatória	(HO <i>et al.</i> , 2013)
21,927	4-Etil-2-metoxi-fenol (etilguaiacol)	1,3 x 10 ⁷	0,5 x 10 ⁷	2,4 x 10 ⁷	0,2 x 10 ⁷	- Fungicida	(ZABKA; PAVELA, 2013)
22,912	4-Metilfenol; <i>p</i> -Cresol	4,5 x 10 ⁷	0,4 x 10 ⁷	4,5 x 10 ⁷	0,3 x 10 ⁷	-Indutor de crescimento	(ICHIKAWA <i>et al.</i> , 1979)
23,050	3-Metilfenol; <i>m</i> -Cresol	9,5 x 10 ⁷	0,5 x 10 ⁷	3,2 x 10 ⁷	0,4 x 10 ⁷	-Indutor de crescimento	(ICHIKAWA <i>et al.</i> , 1979)
24,608	2-Metoxi-4-(1-propenil)- fenol; (isoeugenol)	-	0,4 x 10 ⁶	1,7 x 10 ⁶	-	- Fungicida	(ZABKA; PAVELA, 2013)

24,744	4-Etilfenol	-	-	$8,4 \times 10^6$	-	- Fungicida	(ZABKA; PAVELA, 2013) (LI, Zhanchao <i>et al.</i> , 2019)
26,532	2,6-Dimetoxifenol (siringol)	$3,0 \times 10^8$	$0,7 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$	$0,9 \times 10^8$	-Antioxidante -Fungicida	(CHEN, Shilin; <i>et al.</i> , 2016; ZABKA; PAVELA, 2013)
31,637	4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído (vanilina)	-	$1,3 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$	- Fungicida	(ZABKA; PAVELA, 2013) (BOUNTAGKIDOU; ORDOUDI; TSIMIDOU, 2010)
38,685	4-Hidroxi-3,5-dimetoxi-benzaldeído (siringaldeído)	$3,6 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$	$3,7 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	- Antioxidante -Inibidor de urease	(RAMSAY <i>et al.</i> , 2012)
39,989	2-Metil-1,4-benzenodiol (2-metil-hidroquinona)	$4,8 \times 10^7$	$0,03 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$	$0,02 \times 10^7$	- Fungicida contra <i>Physalospora piricola</i> e <i>Alternaria alternate</i> - Bactericida contra <i>Staphylococcus aureus</i> resistente - Herbicida -Inibidor de urease	(ZHANG, WEI; AI, QIJUN; WU, 2008) (LI, Yong; LI; SON, 2005) (HUANG <i>et al.</i> , 1989)
40,012	1-(4-Hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-etanona	-	$4,1 \times 10^6$	-	$3,6 \times 10^6$	- Acelerador da resposta da planta a infecção bacteriana	(BAKER, C. Jacyn <i>et al.</i> , 2005)
40,642	Hidroquinona	$9,9 \times 10^7$	-	$4,1 \times 10^7$	-	-Indutor de germinação e de crescimento da parte aérea -Inibidor de urease	(KAMRAN <i>et al.</i> , 2017) (BREMNER; DOUGLAS, 1971)

O ácido acético foi identificado na análise cromatográfica de todas as amostras (Tabela 11). Conforme já estabelecido na literatura, o ácido acético é o principal componente do EP e sua proporção varia em média entre 3-7% m/m (THEAPPARAT, Y.; CHANDUMPAI; FAROONGSARNG, 2018), enquanto as frações fenólicas variam de 1-3% (THEAPPARAT, Y. *et al.*, 2015a). São diversas as propriedades benéficas do ácido acético para agricultura, conforme apresentado na Tabela 11, incluindo a tolerância a estresses abiótico, como a seca e o sal.

Estudo publicado em 2017 mostrou que plantas cultivadas na presença do ácido acético (10, 20 e 30 mM) exibiram tolerância à seca notavelmente aumentada. O ácido acético exógeno promoveu a síntese do ácido jasmônico e o enriquecimento da acetilação da histona H4, o que influencia a ativação da via de sinalização do ácido jasmônico para tolerância à seca das plantas (KIM, J. *et al.*, 2017). De acordo com os autores, o ácido acético é convertido em acetil-CoA e é usado como substrato para a acetilação de histonas. Outro trabalho, publicado em 2020, mostrou forte evidências de que a aplicação foliar de ácido acético (20 mM) promove respostas de aclimação à seca na soja, reduzindo o estresse oxidativo, enquanto aumentava a biomassa da raiz, a área foliar, as taxas fotossintéticas e a eficiência do uso de água, levando a um melhor desempenho de crescimento (RAHMAN, M. *et al.*, 2021). Outros estudos, publicados em 2019, mostraram também que a aplicação foliar de ácido acético induz tolerância a seca na cultura de mandioca (UTSUMI *et al.*, 2019) e tolerância a salinidade em feijão mungu (RAHMAN, M. *et al.*, 2019).

Nas pesquisas realizadas por Yatagai *et al.* (2002), o ácido acético demonstrou ser um dos compostos termiticidas mais potentes do EP, embora vários outros ácidos (ácido propanoico e valérico) e compostos fenólicos (4-etil-2-metoxifenol; *o*-cresol; *o*-etil fenol) também apresentem essa atividade (YATAGAI *et al.*, 2002).

Wang *et al.* (2017) identificaram o pirocatecol presente no EP como o principal composto ativo estimulante do crescimento das raízes de uma espécie de tabaco selvagem (*Nicotiana attenuata*). A hidroquinona e o guaiacol também apresentaram efeitos estimulantes, embora as dosagens necessárias para o guaiacol terem sido maiores. Em contrapartida, o resorcinol (1,3-benzenodiol), cuja estrutura se diferencia do pirocatecol e da hidroquinona pela posição da hidroxila no anel aromático, não apresentou qualquer efeito sobre o crescimento das raízes (WANG, M. *et al.*, 2017).

As imagens apresentadas no trabalho de Wang *et al.* (2017) mostraram que o crescimento da raiz induzido pelo pirocatecol não foi devido a um aumento no número de células e sim, devido à expansão das células. Essa expansão requer o afrouxamento da matriz da parede celular. De acordo com os autores, o fenótipo de raiz induzido por pirocatecol resulta de alterações na homeostase de espécies reativas de oxigênio (ROS) no córtex radicular da zona de alongamento das raízes. As ROS são moléculas sinalizadoras que desempenham um papel importante tanto no crescimento e desenvolvimento das plantas quanto nas respostas das plantas ao estresse biótico e abiótico (WANG, M. *et al.*, 2017).

É sabido que os compostos fenólicos extracelulares desempenham funções importantes nas plantas, desde o reforço da parede celular até ações antibióticas e antioxidantes. De acordo com Baker *et al.* (2002), as células de suspensão saudáveis de tabaco e batata têm pools extracelulares significativos de compostos fenólicos que atenuam o estresse oxidativo resultante, por exemplo, do ataque microbiano à planta. O ácido ascórbico e outros antioxidantes fenólicos no apoplasto, junto com as peroxidases, ajudam a regular o potencial redox do apoplasto. De acordo com os autores, é provável que os antioxidantes fenólicos reajam diretamente com a peroxidase e com as espécies de H_2O_2 , enquanto o ácido ascórbico atue regenerando o composto fenólico oxidado. Esse fenômeno tem sérias implicações no que diz respeito aos mecanismos de reação das células vegetais a vários estímulos (BAKER, C. J. *et al.*, 2002).

Baker *et al.* (2005) identificaram a acetosiringona como um dos principais compostos fenólicos extracelulares produzidos pela suspensão de células vegetais de tabaco e demonstraram que este composto está envolvido na aceleração da resposta da planta a infecção bacteriana (BAKER, C. *et al.*, 2005). A acetosiringona foi encontrada nas amostras de eucalipto e acácia negra analisadas no presente trabalho.

Muitos compostos fenólicos encontrados nas amostras de EP analisadas (Tabela 11) apresentam propriedades antioxidantes e antifúngicas reportadas na literatura, inclusive contra fungos filamentosos patogênicos importantes, como os dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* (ZABKA; PAVELA, 2013). Entre os compostos fenólicos com propriedades fungicidas, destacam-se os seguintes: isoeugenol, 2-etilfenol, 4-etilfenol, 2-metoxi-4-metilfenol (4-metilguaiaicol), 4-etilguaiaicol e salicilaldeído.

Embora a atividade antifúngica e antimicrobiana do EP esteja normalmente associada aos derivados fenólicos (MA *et al.*, 2011; MAHMUD *et al.*, 2016; THEAPPARAT, Y. *et al.*,

2015b; WEI; MA; DONG, 2010), outros compostos também desempenham um papel importante nesta propriedade. O ácido propanoico encontrado nas quatro amostras analisadas, por exemplo, tem sido amplamente utilizado em produtos alimentícios como conservante, devido ao seu efeito inibitório sobre o crescimento de microrganismos (YUN; LEE, 2016). Nesse sentido, Yun e Lee (2016) revelaram que o ácido propanoico induz a morte celular de fungos por apoptose mediada por mitocôndrias. Adicionalmente, o furfural é um ingrediente ativo de pesticida, possui propriedades, não apenas fungicidas, mas também nematicidas (EL-MOUGY, Nehal S. *et al.*, 2008). Ainda, uma patente chinesa (CN102458125B) refere-se ao uso de compostos de ciclopentanodiona como inseticida, acaricida e/ou fungicida.

Experimentos com rizobactérias do gênero *Bacillus* mostraram que os voláteis produzidos por essas bactérias eram responsáveis pelo aumento do crescimento (RYU *et al.*, 2003) e pela indução de resistência sistêmica (RYU *et al.*, 2004) nas plantas de *Arabidopsis*. Esses voláteis foram identificados como acetoína e 2,3-butanodiol. Nas mudas de *Arabidopsis* expostas a misturas dos voláteis acetoína e 2,3-butanodiol, a gravidade da doença podridão-mole, causada pelo patógeno bacteriano *Erwinia carotovora subsp. carotovora*, foi significativamente reduzida em comparação com mudas não expostas antes da inoculação do patógeno. A exposição aos compostos orgânicos voláteis e rizobactérias por apenas 4 dias foi suficiente para ativar resistência sistêmica induzida em mudas de *Arabidopsis*. A acetoína foi encontrada em todas as amostras de EP analisadas no presente trabalho (Tabela 11). A grande variabilidade e a atividade sinérgica dos diversos componentes do EP podem dificultar o desenvolvimento de resistência por parte dos microrganismos (MATTOS *et al.*, 2019; SURESH *et al.*, 2019), o que torna o EP um produto ainda mais interessante para aplicação na proteção dos cultivos de interesse agrícola.

Na indústria alimentícia, segundo Rozum (2014), os aldeídos e cetonas alifáticos são responsáveis pela característica corante das fumaças líquidas conferida às carnes através da reação de Maillard, sendo o hidroxiacetaldeído o principal aldeído responsável por esse efeito (ROZUM, 2014). Por outro lado, o siringol e seus derivados são os principais responsáveis pelo sabor de defumado e propriedade antioxidante. Embora, o guaiacol, o furfural, o cicloteno, o maltol, as cetonas aromáticas e os aldeídos também desempenhem papéis importantes na composição geral do sabor e aroma conferido ao alimento. Wasserman (1966) demonstrou que a mistura dos três principais compostos (guaiacol, 4-metil guaiacol e siringol) nas proporções

encontradas no EP não é suficiente para fornecer o aroma defumado característico desejável (WASSERMAN, 1966).

5.3 Inibição da Urease *in vitro* das amostras

Após a caracterização, as amostras foram submetidas ao ensaio de inibição da urease *in vitro*. O efeito inibitório dos EPs sobre a urease de *Canavalia ensiformis* (Jack Bean) revelou um comportamento concentração dependente (Figura 12). A partir das curvas de inibição em função das concentrações (Figura 13) foi possível calcular a concentração mínima para inibir 50% da urease (IC_{50}), apresentada na Tabela 12.

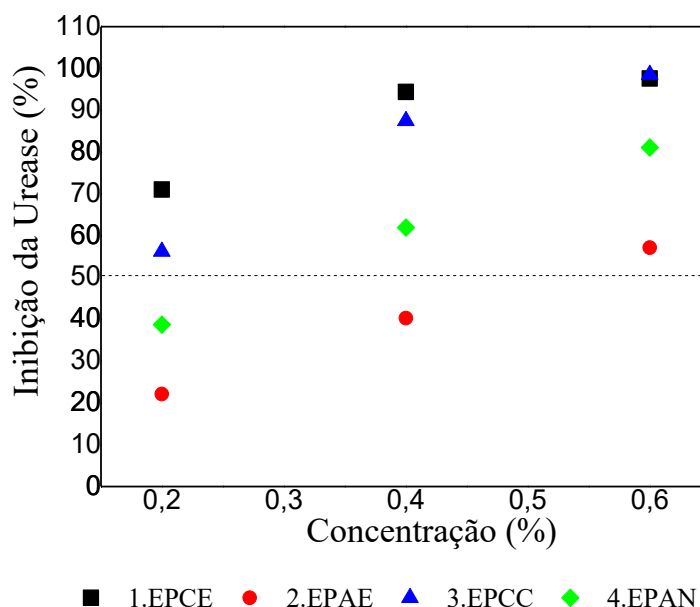


Figura 12: Gráfico de concentração dos extratos pirolenhosos *versus* efeito inibitório *in vitro* da atividade da urease de *Canavalia ensiformis* (Jack Bean).

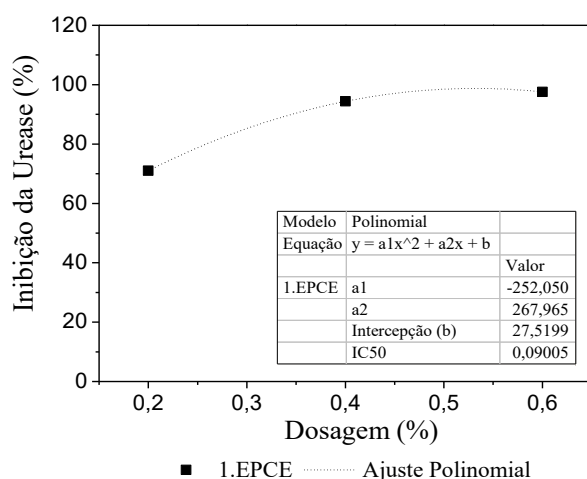
Tabela 12. Concentração mínima dos extratos pirolenhosos de eucalipto (1.EPCE e 2.EPAE)*, casca de coco (3.EPCC)* ou acácia negra (4.EPAN)* para inibir 50% da atividade (IC₅₀) da urease de *Canavalia ensiformis* (Jack Bean).

Parâmetros	1.EPCE	2.EPAE	3.EPCC	4.EPAN	Ácido Aceto-hidroxâmico
IC ₅₀	0,0901% v/v	0,5162% v/v	0,1697% v/v	0,3001% v/v	0,0012% m/v 0,16 mM

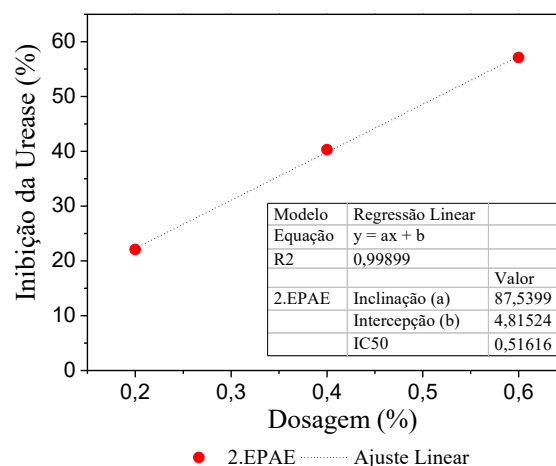
*1.EPCE Extrato pirolenhoso de eucalipto produzido em forno de metálico industrial (Forno Container) 2.EPAE: Extrato pirolenhoso de eucalipto produzido em forno de alvenaria; 3.EPCC: Extrato pirolenhoso de casca de coco produzido em forno metálico; EPAN: Extrato pirolenhoso de acácia negra produzido em forno de alvenaria.

**Ácido acetohidroxâmico, reconhecido inibidor de urease, foi empregado como controle positivo.

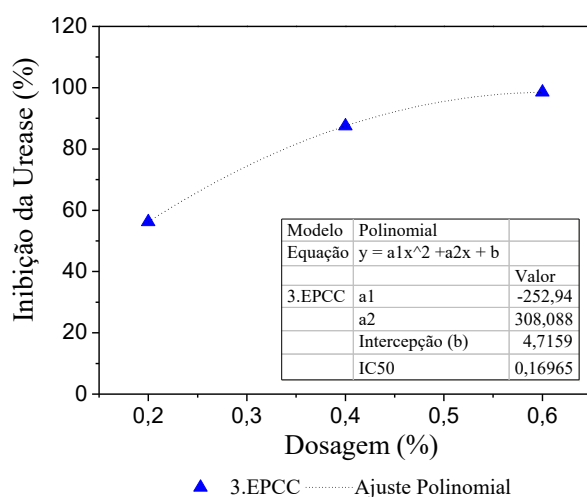
A



B



C



D

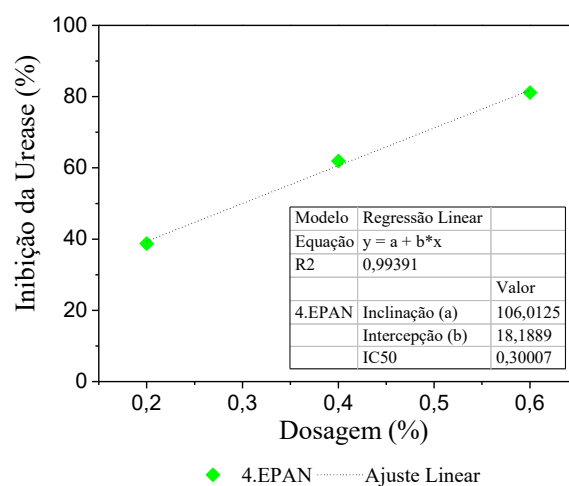


Figura 13: Curvas de inibição da urease *versus* dosagem dos extratos pirolenhosos

Os resultados *in vitro* de inibição da urease pelas amostras de EP mostraram-se promissores, embora, à primeira vista, sejam inferiores ao inibidor de referência (ácido aceto-

hidroxâmico; Tabela 12). É válido destacar que o EP, um subproduto da produção de carvão vegetal, consiste em uma solução aquosa com centenas de compostos orgânicos e teor de umidade entre 80 e 90%. Dessa forma, descontando a porcentagem referente à água e outros compostos sem atividade, é provável que os compostos inibidores da urease presentes no EP tenham atividades ainda superiores ao ácido aceto-hidroxâmico. Os valores de IC₅₀ encontrados para todas as amostras são praticamente equivalentes ou inferiores às dosagens mínimas normalmente aplicadas de EP na agricultura (0,5% do volume de calda, aproximadamente, 1 litro de EP por hectare).

As amostras 1.EPCE e 3.EPCC, produzidas nos fornos metálicos, com carbonizações mais rápidas, mostraram uma capacidade inibitória da urease superior às demais produzidas em fornos de alvenaria com pirolise lenta (2.EPAE e 4.EPAN). Estas amostras (1.EPCE e 3.EPCC) foram as que apresentaram maiores teores de carbono orgânico, ácidos húmicos, ácidos fúlvicos, fenóis, Brix (Tabela 10), além de uma maior concentração de picos nas análises cromatográficas. Isso se explica porque em pirólises intermediárias, com menores tempos de residência em relação à pirolise lenta, como é o caso do processo produtivo das amostras 1.EPCE e 3.EPCC, a degradação dos compostos voláteis da biomassa ocorre em menor extensão (AL-HAJ IBRAHIM, 2020), o que justifica a maior concentração de substâncias no EP. Além disso, os sistemas de coleta do extrato pirolenhoso nos fornos metálicos tendem a ser mais eficazes, enquanto nos fornos de alvenaria são mais comuns as perdas de compostos voláteis devido a escapes.

Alguns dos compostos detectados por cromatografia nas amostras de EP apresentam atividade anti-ureolítica já relatada na literatura, sendo eles o acetol (TANAKA; KAWASE; TANI, 2004), a hidroquinona (ZHAO; ZHOU, 1991), o pirocatecol (MAZZEI, Luca *et al.*, 2017a), o siringaldeído (RAMSAY *et al.*, 2012) e a 2-ciclopenten-1-ona (TANAKA; KAWASE; TANI, 2003).

Embora presente em todas as amostras de EP analisadas neste trabalho, o acetol está presente em maiores concentrações na amostra 1.EPCE. A 2-ciclopenten-1-ona foi encontrada em concentrações relativamente próximas nas amostras 1.EPCE e 3.EPCC, mas em concentrações muito inferiores nas amostras 2.EPAE e 4.EPAN. O siringaldeído foi encontrado em todas as amostras, embora em baixas concentrações. Enquanto, a hidroquinona foi encontrada apenas nas amostras 1.EPCE e 3.EPCC.

Nos experimentos reportados na literatura a 2-ciclopenten-1-ona apresentou IC₅₀ igual a 0,97 mM (TANAKA; KAWASE; TANI, 2003) e o acetol igual a 2,9 mM (TANAKA; KAWASE; TANI, 2004). Ambos apresentaram uma atividade moderada em comparação com o ácido aceto-hidroxâmico e a hidroxiiureia, consagrados inibidores da urease.

Ao comparar as amostras produzidas nos fornos de alvenaria, observa-se que a capacidade inibitória do EP de acácia negra (4.EPAN) foi superior ao extrato obtido a partir do eucalipto (2.EPAE), embora o perfil cromatográfico (Figura 8) de ambas seja relativamente semelhante. É provável que parte dos compostos envolvidos na inibição da urease pode não ter sido identificada pelo método cromatográfico utilizado, como é o caso, por exemplo, das substâncias húmicas. A amostra EPAN apresentou maior teor de ácidos húmicos e fúlvicos em relação a amostra 2.EPAE, o que possivelmente está contribuindo para sua maior capacidade inibitória.

Vaughan e Ord (1991) avaliaram a atividade inibitória da urease de substâncias húmicas. Os experimentos foram realizados com a urease purificada de *Bacillus pasteurii*. Foram testados ácidos húmicos e fúlvicos extraídos de solo agrícola, além de cinco modelos sintéticos de ácidos húmicos (preparados a partir de cada um dos compostos fenólicos: pirocatecol, guaiacol, pirogallol, resorcinol e ácido protocatecuico) e um modelo sintético de ácido fúlvico (preparado com ácido polimaleico). Com exceção do pirocatecol, os compostos fenólicos utilizados no preparo dos ácidos húmicos não apresentaram atividade inibitória quando avaliados sozinhos. Os autores ainda avaliaram um ácido húmico tratado com baixo teor de cinza (0,12% p/p). Em pH 4,0, todas as substâncias húmicas testadas inibiram a atividade da urease de maneira concentração-dependente (0,1 a 100 µg mL⁻¹). Na concentração de 10 µg mL⁻¹ as nove amostras de substâncias húmicas promoveram inibições de 32-46%, enquanto na concentração 100 µg mL⁻¹ as porcentagens de inibição foram de 69-83%. As substâncias húmicas modelo e com baixo teor de cinzas inibiram a atividade da urease na mesma extensão dos ácidos húmicos e fúlvicos extraídos do solo agrícola, indicando que a inibição da urease não foi devida aos componentes inorgânicos. Os autores também mostram que a porcentagem de inibição da urease produzida por substâncias húmicas é dependente do pH e tende a diminuir consideravelmente com o aumento do pH de 4 para 5 (VAUGHAN; ORD, 1991).

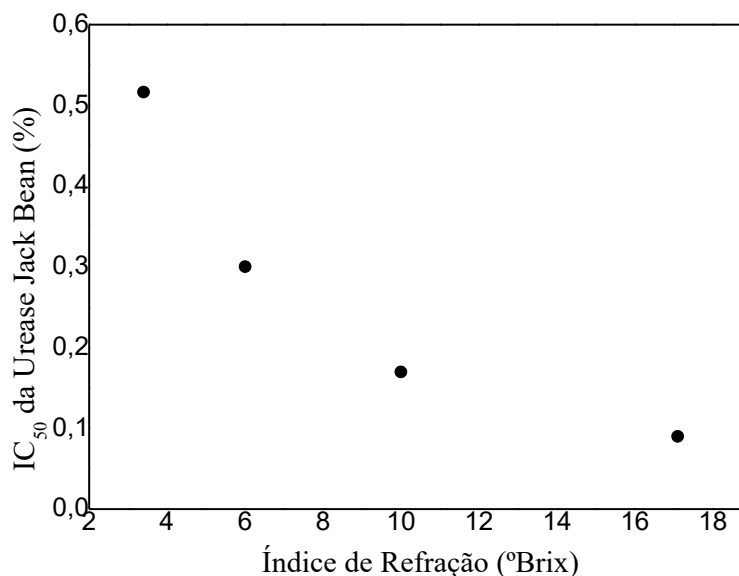


Figura 14. Correlação entre o índice de refração (°Brix) e a concentração mínima necessária das amostras de extrato pirolenhoso para inibir 50% da atividade enzimática da urease de *Canavalia ensiformis* (IC₅₀).

Os resultados apresentados na Figura 14 sugerem que o teor de Brix pode ser um indicador útil na identificação de amostras de extrato pirolenhoso com baixos valores de IC₅₀ da urease. A correlação inversa observada entre o °Brix e o IC₅₀ mostram que amostras com maiores concentrações de sólidos solúveis, tendem a exibir uma maior eficácia na inibição da urease. Portanto, a medição do Brix pode ser uma ferramenta preliminar e rápida para selecionar amostras de extrato pirolenhoso que possam ter potencial como inibidores da urease, poupando tempo e recursos em estudos subsequentes de caracterização e avaliação. No entanto, é importante lembrar que essa relação pode ser influenciada por diversos fatores, e a análise detalhada das propriedades químicas das amostras ainda é fundamental para compreender completamente sua eficácia como inibidores da urease.

5.4 Inibição da Urease *in vitro* das frações

É sabido que o EP contém mais de 300 compostos, cuja concentração é geralmente inferior a 1%, com exceção do ácido acético, cuja concentração varia em média de 3 a 7% (THEAPPARAT, Y. et al., 2014). Portanto, provou-se difícil isolar compostos individuais de

tais misturas. Com o intuito de identificar os principais compostos envolvidos na atividade anti-ureolítica do EP, a amostra 1.EPCE, que apresentou melhor capacidade inibitória da urease *in vitro*, foi processada e separada em seis subgrupos com concentrações distintas de componentes em cada um, identificados pelo solvente de extração (hexano, tolueno, clorofórmio, diclorometano, MTBE, butanol). As extrações sequenciais permitiram uma maior separação dos picos para facilitar a identificação dos compostos por CG-EM.

Foram identificados um total de 378 picos diferentes nas seis frações. Destes, 278 apresentaram espectros de massa com mais de 80% de similaridade com um composto conhecido da biblioteca NIST e WILEY. Os 100 compostos com a maior área são mostrados no ANEXO II.

A amostra 1.EPCE e as seis frações extraídas foram avaliadas quanto à sua capacidade de inibir a urease *in vitro*. A fração extraída com clorofórmio apresentou a maior atividade de inibição, seguida das frações extraídas com tolueno e diclorometano (Figura 15).

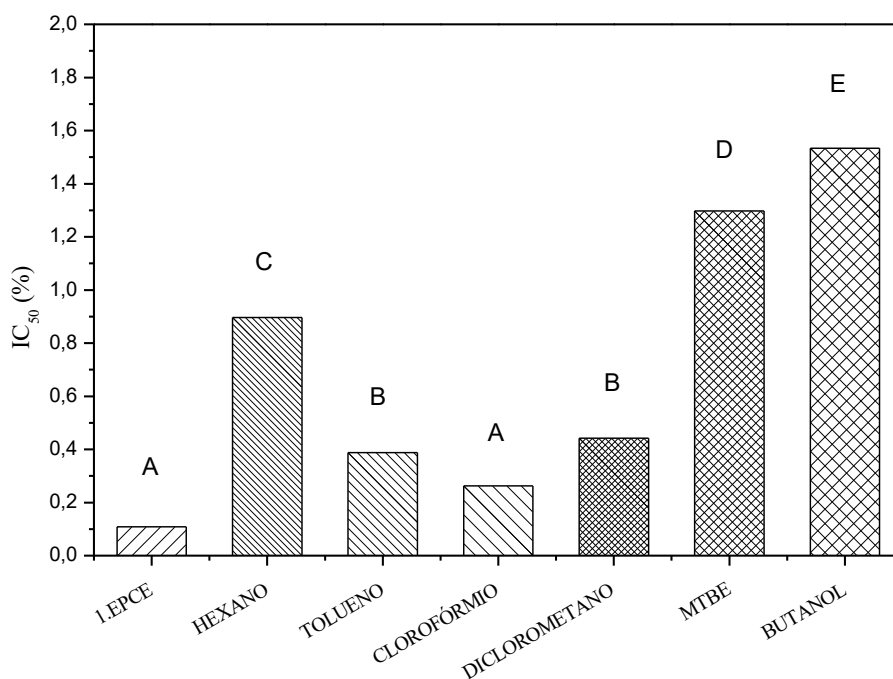


Figura 15: Concentração mínima necessária da amostra de extrato pirolenhoso de eucalipto produzido em forno metálico (1.EPCE) e de suas frações extraídas com os seis solventes: hexano, tolueno, clorofórmio, diclorometano, MTBE, butanol para inibir 50% da atividade enzimática da urease de *Canavalia ensiformis* (IC₅₀).

Alguns dos compostos identificados em CG-EM foram avaliados separadamente quanto à sua capacidade de inibir a urease *in vitro*, sendo eles: ácido acético; 1,2-benzenodiol; 3-metoxicatecol; 4-metilcatecol; hidroquinona; metil-hidroquinona; 4-etilresorcinol; aceto-hidrazina; ácido crotônico; hidroxiacetona; maltol; anidrido maleico; ácido 2,6-di-hidroxibenzóico; ácido acrílico; aminofenol; vanilina; siringaldeído; cicloteno (metil ciclopentenolona); ácido levulínico; delta-valerolactona; fenol; 3-metil-2-ciclopentenona, 4-hidroxycumarina; levoglucosan. Outros compostos com estruturas semelhantes, mas que não foram identificados no EP, também foram avaliados: 2-metoxi-hidroquinona; resorcinol; 2,4-di-hidroxibenzaldeído; 3,4-di-hidroxibenzaldeído; 3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzaldeído; pirogalol; 2,3,4-tri-hidroxibenzaldeído; floroglucinol; ácido gálico; ácido fumárico; 4-metoxiacetofenona; 2-dimetil-aminofenol; o-fenilenodiamina; linoleato de metila. Os valores de IC₅₀ dos compostos que apresentaram atividade anti-ureolítica estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13: Valores de IC₅₀ de compostos identificados nas análises de CG-EM das frações extraídas da amostra de extrato pirolenhoso 1.EPCE e outros compostos com estruturas semelhantes que apresentaram atividade anti-ureolítica.

Composto	IC ₅₀ (μM) médio
4-Metilcatecol	1,51 ± 0,03
Pirocatecol; 1,2-benzenodiol	3,2 ± 0,1
3-Metoxicatecol	5,6 ± 0,9
2-Metoxi-hidroquinona	18 ± 3
Hidroquinona	27 ± 5
2-Metil-hidroquinona, (2-metil-1,4-benzenodiol) ^a	32 ± 5
4-Etilresorcinol	40 ± 10
Pirogalol ^a	42 ± 4
2,3,4-Trihidroxibenzaldeído	42 ± 3
Ácido gálico ^a	45 ± 12
Resorcinol ^a	46 ± 2
Floroglucinol ^a	52 ± 13
3,4-Dihidroxibenzaldeídoa	55 ± 4
2,4-Dihidroxibenzaldeídoa	60 ± 5
Hidroxiacetona (acetol)	86 ± 20
Ácido 2,6-di-hidroxibenzoico	86 ± 39
Aceto-hidrazida ^a	89 ± 29
Ácido acetohidroxâmico ^b	28 ± 6

^a Compostos com estruturas semelhantes, mas que não foram identificados em PA

^b Controle positivo

Nota: Os seguintes compostos não apresentaram capacidade inibitória da urease *in vitro* nas dosagens avaliadas: ácido acético, ácido acrílico, ácido fumárico, maltol, 4-metoxiacetofenona, anidrido maleico, 2-dimetil-aminofenol, 3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzaldeído (siringaldeído), vanilina, o-fenilenodiamina, 2-hidroxi-3-metil-2-ciclopenten-1-ona (cicloteno), ácido 4-oxo-pentanóico (ácido levulínico), linoleato de metila, delta-verolactona, 3-metil 2-ciclopentenona, 4-hidroxycumarina, fenol e ácido crotônico.

Dos compostos analisados, os resultados mostraram que o pirocatecol e seus derivados (4-metilcatecol e 3-metoxicatecol) foram os que apresentaram maior capacidade inibitória da urease *in vitro*, seguido da hidroquinona e derivados (2-metoxihidroquinona, 2-metilhidroquinona).

5.5 Docking Molecular e Dinâmica

O docking molecular foi realizado para entender a atividade inibitória do PC e MC. Observou-se que esses derivados realizaram interações semelhantes no sítio alostérico, incluindo ligação de hidrogênio com His323, interação π -alquil com Ala170 e interação de van der Waals com Ala366. Esses resultados sugerem que ambos os compostos assumem orientações semelhantes que facilitam o mecanismo de inibição baseado em radicais através de uma adição nucleofílica do tipo Michael envolvendo Cys322 e a formação de uma ligação covalente S-C em orto ou meta carbono em relação aos grupos hidroxila (Figura 16) (PAGONI *et al.*, 2019). Além disso, para o derivado MC, o grupo metil realizou interação π -alquil adicional com o resíduo Lys169, conduzindo a melhor orientação para o ataque nucleofílico Cys322 em uma distância baixa entre o carbono do ligante e o enxofre do aminoácido em comparação com o composto PC (4,15 e 3,75 Å para PC e MC, respectivamente), o que pode ter contribuído para sua maior atividade anti-ureolítica (Tabela 13).

Simulações de MD foram realizadas inicialmente para avaliar a estabilidade da proteína-ligante no sítio alostérico do alvo. Para ambos os compostos, os gráficos RMSD para os átomos C α do esqueleto da urease na presença dos ligantes não mostram flutuações significativas. Esses resultados indicaram alta afinidade de ligação e estabilidade dos complexos ao final da simulação (Figura 17) (IDRIS *et al.*, 2020; KUMAR *et al.*, 2018). Além disso, suas poses de docking mostraram desvios mínimos e todas as interações foram mantidas durante as simulações de MD, indicando que os resultados do docking molecular são confiáveis.

O docking molecular dos compostos PC e MC que apresentam atividade anti-ureolítica pode ser utilizado em trabalhos futuros para triagem de compostos com potencial para inibição da urease.

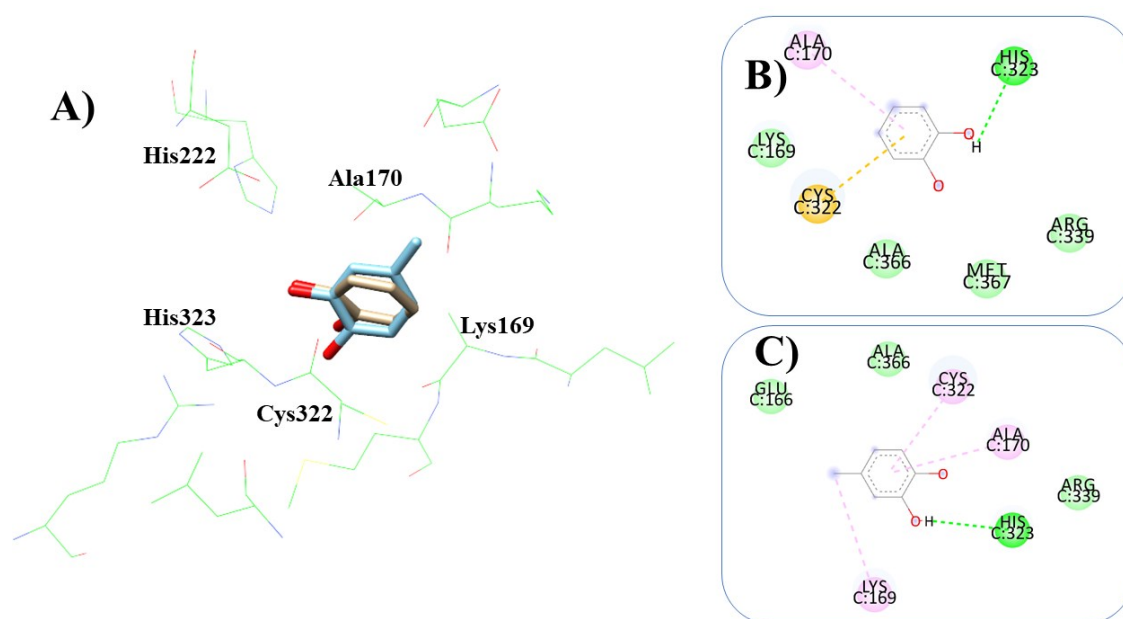


Figura 16: Arranjo espacial após encaixe do 02 (bege) e 25 (ciano) no sítio alostérico da urease (A). Interações de 02 (B) e 25 (C) com resíduos da urease.

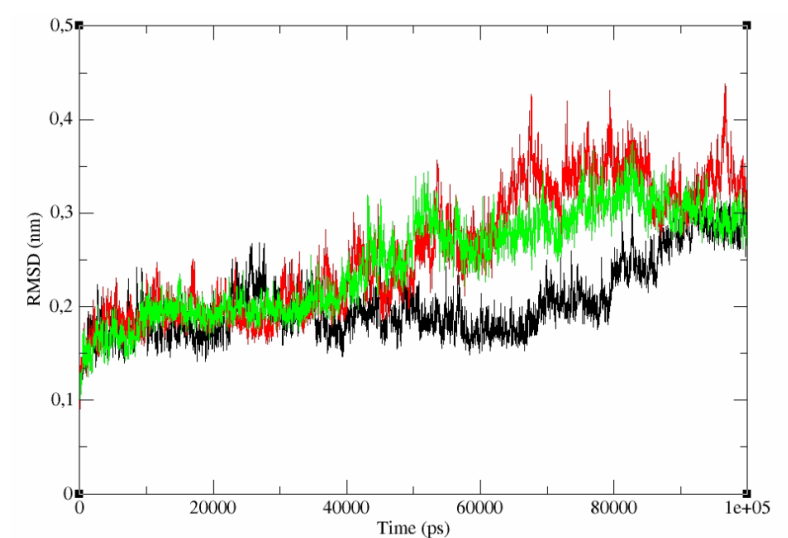


Figura 17: Gráficos RMSD para os átomos do esqueleto C α da urease livre (linha preta) e em complexo com PC (linha vermelha) e MC (linha verde).

5.6 Inibição da urease em sistema fechado com fluxo de ar contínuo

O teste de volatilização da amônia foi realizado para avaliar os efeitos dos tratamentos com os extratos 1.EPCE e 2.EPAE e os compostos PC e MC sobre o grau de volatilização da

amônia emitida pela ureia. O NBPT, o mais bem sucedido inibidor da urease do mercado, foi utilizado como controle positivo. Na Figura 18 é possível observar que a ureia tratada com os compostos PC ou MC apresentou o mesmo perfil de volatilização da ureia isolada com taxas de perdas semelhantes (Tabela 14), indicando que, nas concentrações testadas, essas substâncias não apresentaram atividade inibitória. Os compostos PC e MC foram aplicados na mesma concentração utilizada na formulação comercial de NBPT (Agrotain Ultra®), e possivelmente precisariam de uma dosagem mais alta para serem capazes de reduzir a volatilização da ureia no solo.

Após 24 h do início do experimento, a taxa de perda de N dos tratamentos com 2.EPAE e com NBPT foi significativamente menor (85,33 e 98,58%, respectivamente; $p < 0,05$), em relação à ureia sem aditivo. Nesta mesma etapa do experimento, não foi possível obter a medida da quantidade de amônia volatilizada do tratamento com ureia + 1.EPCE, pois as armadilhas de amônia estavam com pH menor ($\text{pH} = 4,67 \pm 0,10$) que a solução de ácido bórico introduzida no início do experimento ($\text{pH} = 5,04$). Considerando que a quantidade de amônia volatilizada é medida por titulação potenciométrica da solução de ácido bórico, cujo pH aumenta com a volatilização da amônia, acredita-se que possa ter ocorrido o transporte de ácidos voláteis do extrato, resultando na redução do pH dos coletores.

No tempo de 48 h, observou-se a volatilização máxima para os tratamentos com MC, PC e 2.EPAE, que não tiveram diferença estatisticamente significativa em relação à ureia isolada. Enquanto, os tratamentos com 1.EPCE e NBPT resultaram em menores perdas de N, em relação à ureia (90,76% e 98,80% menores, respectivamente).

O tratamento com a amostra 2.EPAE apresentou resultados de taxa de perda de N semelhantes ao tratamento com ureia isolada para os tempos de 48, 72, 96, 122 e 144h. O pico máximo de volatilização para o tratamento ureia + extrato de 1.EPCE foi observado no tempo de 72h e para o tratamento ureia + NBPT o pico foi observado no tempo de 122h. Para ambos os tratamentos, observou-se um atraso no aparecimento do pico máximo de volatilização, bem como uma redução no seu volume.

Analisando a porcentagem de perda de N ao final do experimento (Tabela 14), observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa na porcentagem de perda de N acumulado pelos tratamentos com substâncias PC e MC e ureia isolado (ureia sem aditivo, $23,78 \% \pm 1,35$; ureia + MC, $23,11 \% \pm 3,18$; ureia + PC, $24,16 \% \pm 2,68$; $p > 0,9$). Ao comparar os dois extratos testados, o extrato 1.EPCE foi mais eficiente que o 2.EPAE, com diferença

estatisticamente significativa entre a porcentagem de perda acumulada de N gerada por eles ($9,25 \% \pm 0,92$ e $17,79\% \pm 3,51$, respectivamente; $p=0,0013$). Ambos também foram mais eficientes do que o tratamento com ureia isolada resultando em uma redução na perda acumulada de N de 25,19% para 2.EPAE e 61,10% para 1.EPCE. O tratamento com ureia + NBPT também resultou em redução de 67,07% na perda acumulada de N. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o tratamento com NBPT e com o extrato 1.EPCE para a porcentagem de N acumulado perdido ($7,83\% \pm 1,12$ e $9,25\% \pm 0,92$, respectivamente; $p=0,9695$).

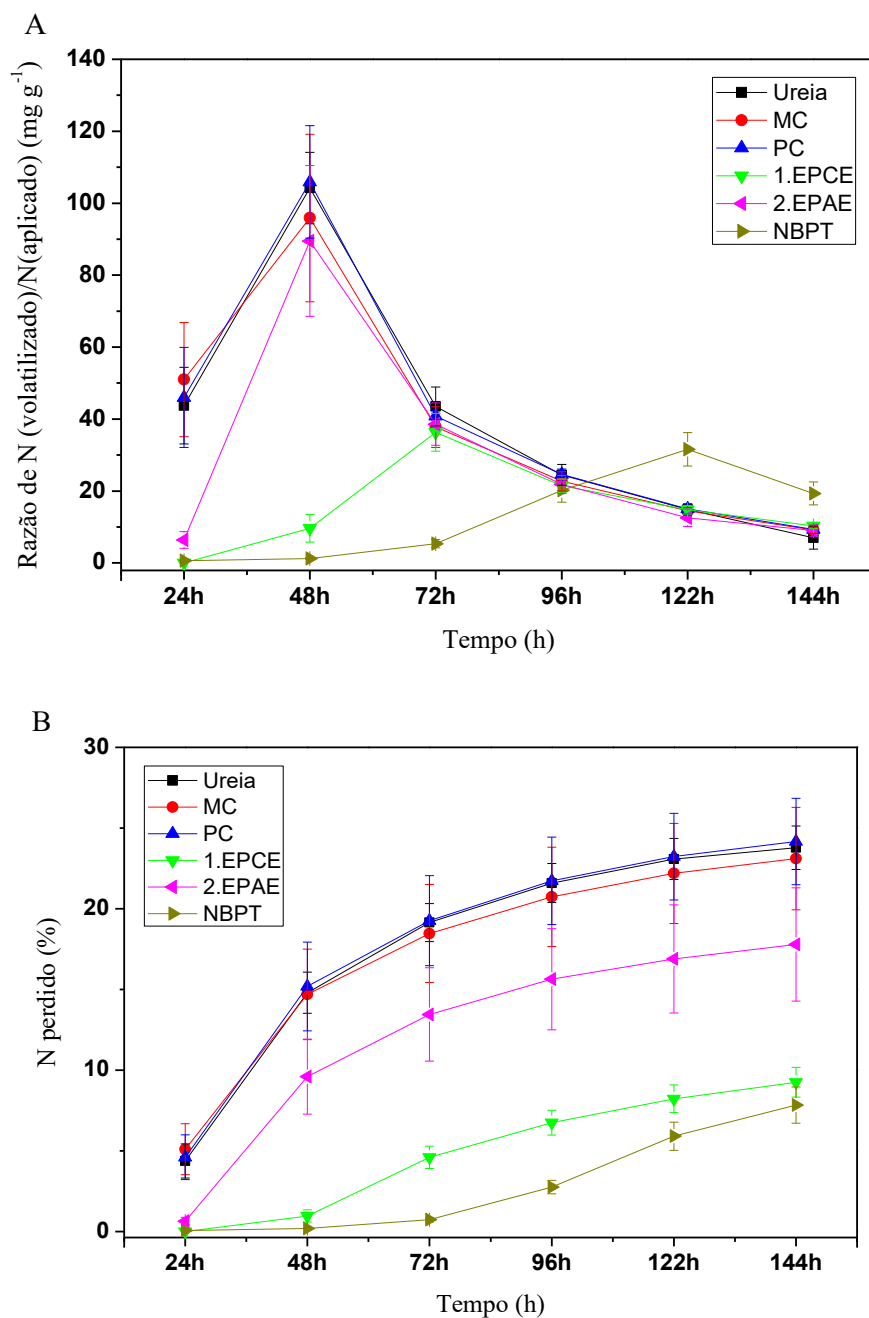


Figura 18: (A) Razão entre nitrogênio volatilizado e nitrogênio aplicado de ureia isolada, ureia + NBPT, ureia + pirocatecol (PC), ureia + 4-metilcatecol (MC); ureia + extrato de EPBE e ureia + extrato de EPCE. (B) Perda acumulada de nitrogênio ao longo do tempo de ureia não tratada, ureia tratada com NBPT ou com pirocatecol (PC), ou 4-metilcatecol (MC), ou extrato de EPBE, ou extrato de EPCE. * Indica um ponto no tratamento EPCE onde não foi possível medir amônia volatilizada.

Tabela 14: Média e desvio padrão da média da razão entre nitrogênio volatilizado e nitrogênio aplicado e percentual de N perdido da ureia isolada, ureia + NBPT, ureia + pirocatecol (PC), ureia + 4-metilcatecol (MC); ureia + extrato de 2.EPAE e ureia + extrato de 1.EPCE.

Tratamentos	Razão de N (volatilizado)/N(aplicado) (mg.g ⁻¹)						N perdido (%)
	24h	48h	72h	96h	122h	144h	
Ureia	43,70 ± 10,65 ^a	104,20 ± 9,93 ^a	43,49 ± 5,38 ^a	24,50 ± 2,92 ^a	14,86 ± 1,50 ^a	7,02 ± 3,15 ^a	23,78 ± 1,35 ^a
MC	50,98 ± 15,85 ^a	95,89 ± 23,30 ^a	37,78 ± 5,69 ^a	22,71 ± 2,67 ^a	14,52 ± 0,85 ^a	9,19 ± 0,81 ^a	23,11 ± 3,18 ^{ab}
PC	46,00 ± 13,92 ^a	105,90 ± 15,63 ^a	40,78 ± 0,87 ^a	24,61 ± 1,49 ^a	15,03 ± 1,45 ^a	9,33 ± 1,15 ^a	24,16 ± 2,68 ^a
1.EPCE	0,00 ± 0,00 [*]	9,63 ± 3,80 ^b	36,32 ± 5,23 ^a	21,45 ± 1,84 ^a	14,81 ± 1,19 ^a	10,29 ± 0,73 ^a	9,25 ± 0,92 ^c
2.EPAE	6,41 ± 2,32 ^b	89,50 ± 20,96 ^a	38,59 ± 5,90 ^a	21,81 ± 2,51 ^a	12,58 ± 2,45 ^a	8,99 ± 1,54 ^a	17,79 ± 3,51 ^b
NBPT	0,62 ± 0,06 ^b	1,25 ± 0,27 ^b	5,38 ± 1,14 ^b	20,19 ± 3,27 ^a	31,56 ± 4,64 ^b	19,32 ± 3,21 ^b	7,83 ± 1,12 ^c

Resultados apresentados como média ± desvio padrão da média (n=4). Letras diferentes representam diferença significativa entre os parâmetros avaliados (p<0,05). Os dados foram avaliados por One-way ANOVA (pós-teste de Tukey). * Indica um ponto no tratamento EPCE onde não foi possível medir amônia volatilizada.

É importante que os inibidores da urease para aplicação no solo, diferentemente dos inibidores para fins medicinais, tenham custos mais acessíveis, em função do grande volume necessário (KAFARSKI; TALMA, 2018). Neste sentido, o EP se mostra uma excelente opção, tendo em vista seu baixo custo, biodegradabilidade (HAGNER, Marleena; LINDQVIST; *et al.*, 2020), baixa ou nenhuma toxicidade (HAGNER, Marleena, 2013), além dos demais benefícios conferidos ao solo e ao desenvolvimento das plantas.

Sivaram *et al.* (2022) mostraram que o EP aplicado nas concentrações de 0,05 e 0,1% m/m de solo, promove maior diversidade microbiana, principalmente dos gêneros bacterianos promotores de crescimento das plantas como *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Herbaspirillum*, *Acetobacter*, *Beijerinckia*, quando comparado ao solo não tratado e ao solo tratado com concentrações mais altas de EP (SIVARAM *et al.*, 2022).

Existem poucos trabalhos que avaliaram o efeito do EP como um inibidor da urease, até a data desta publicação. Sendo que alguns trabalhos de aplicação do EP no solo indicam aumento da atividade desta enzima (LU, Haifei *et al.*, 2015), enquanto outros mostram a inibição (LEE *et al.*, 2021; PARK; PARK, 2017). Possivelmente, a existência de resultados controversos está relacionada ao fato de o EP apresentar compostos inibidores em sua composição, mas também atuar como promotor do crescimento e da atividade microbiana do

solo, conforme resultados reportados por Lu *et al.* (2015) e Sivaram *et al.* (2022), levando conseqüentemente ao aumento das atividades enzimáticas microbiana (LU, Haifei *et al.*, 2015). Embora os experimentos *in vitro*, como os apresentados no presente trabalho, sejam limitados por não representarem de forma fiel as condições reais de aplicação, eles apresentam como vantagem a capacidade de isolar o efeito inibitório do efeito promotor do crescimento microbiano, diferentemente dos experimentos conduzidos no solo. A irrigação com EP após aplicação da ureia, além de inibir a urease, mitiga a transformação do NH_4^+ em NH_3 em decorrência da redução do pH (WIN *et al.*, 2009) e favorece a incorporação e o movimento do NH_4^+ para camadas mais profundas do solo, reduzindo consideravelmente as perdas por volatilização, além de contribuir para o aumento da fertilidade do solo, devido a presença dos ácidos húmicos e fúlvicos em sua composição (ROSE *et al.*, 2014).

A biodegradabilidade do EP foi avaliada em condições de laboratório e de campo na Finlândia por Hagner *et al* (2020a). Nos ensaios de laboratório, realizados de acordo com a diretriz 301F da OECD (1992) “Respirometria manométrica”, o EP foi classificado como prontamente biodegradável, uma vez que atingiu 76% de biodegradação durante os primeiros 10 dias. No campo, as concentrações dos principais compostos presentes no EP (ácido acético, ácido fórmico, aldeídos, ftalatos, fenóis e hidrocarbonetos) foram iguais ao controle após 4 semanas, indicando que o EP, em sua maior parte, é degradado no solo em um mês. Os compostos do EP servem de fonte de carbono para a microbiota do solo e estimulam seu desenvolvimento. Outros benefícios da utilização do extrato pirolenhoso no solo incluem a solubilização de nutrientes, como fosfatos, a remoção de carbonatos indesejados e o aumento da porosidade do solo (UTHAYAKUMAR; PRABAKAR; AZIS, 2011).

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados desta pesquisa, pode-se concluir que o extrato pirolenhoso (EP), subproduto da indústria de carvoejamento, apresenta potencial para ser utilizado na agricultura como inibidor da urease. Amostras de EP, obtidas a partir da carbonização de diferentes biomassas (eucalipto, acácia negra e casca de coco) e em processos produtivos distintos (fornos de alvenaria e fornos metálicos), mostraram diferentes composições e atividades inibitórias variadas contra a urease de *Canavalia ensiformis* (Jack Bean). O EP de eucalipto produzido em forno metálico industrial apresentou a maior atividade inibitória, seguido do EP de casca de coco também produzido em forno metálico e, por último, os EPs de acácia negra e eucalipto produzidos em fornos de alvenaria. A mesma sequência também foi observada quanto aos teores de carbono orgânico, fenóis, Brix e substâncias húmicas (ácidos húmicos + ácidos fúlvicos).

A correlação inversa entre o índice de refração (°Brix) e o IC_{50} da urease sugere que o °Brix pode ser um indicador útil na triagem inicial das amostras de extrato pirolenhoso. Sua simplicidade e rapidez o tornam uma ferramenta prática, permitindo a identificação de amostras promissoras para estudos posteriores e facilitando a padronização e monitoramento da qualidade dessas amostras ao longo do processo de produção.

Neste trabalho foi reportado pela primeira vez quais compostos estariam envolvidos na atividade anti-ureolítica do EP, com destaque para o pirocatecol, 4-metilcatecol, 3-metoxicatecol, hidroquinona e 2-metil-hidroquinona. Além disso, a capacidade do EP de inibir a volatilização de amônia emitida pela ureia no solo foi avaliada e demonstrou resultados promissores. A amostra 1.EPCE mostrou-se eficiente, reduzindo em 61,1% a perda acumulada de N em relação ao tratamento apenas com ureia, equiparando-se ao NBPT, um inibidor de urease amplamente utilizado no mercado. Esses resultados são relevantes, uma vez que a utilização do EP como um inibidor da urease irá auxiliar na redução das perdas de nitrogênio, trazendo economia nas aplicações de fertilizantes e mitigando a emissão de gases de efeito estufa, além de proporcionará benefícios ao solo e ao desenvolvimento das plantas.

Considerando que o Brasil é o maior produtor de carvão vegetal do mundo, o amplo potencial para fornecer EP para aplicação na agricultura, tanto no mercado nacional quanto internacional, pode contribuir para um agronegócio mais sustentável, favorecendo o desenvolvimento das plantas e a preservação do meio ambiente. Estes resultados abrem

perspectivas interessantes para futuros estudos visando a aplicação prática e o aprofundamento do conhecimento sobre o uso do EP como inibidor da urease na agricultura. Uma delas diz respeito ao estudo dos efeitos sinérgicos entre os compostos presentes no EP que demonstraram atividade anti-ureolítica. Considerando a complexidade da composição química do EP, é possível que a interação entre esses compostos possa ampliar ainda mais a eficácia na inibição da urease. Estudos que investiguem a possível potencialização dos efeitos anti-ureolíticos quando esses compostos atuam em conjunto podem contribuir na formulação de novos inibidores de urease. Outra perspectiva futura importante diz respeito a realização de testes em campo para validar a eficácia do EP em condições reais de cultivo. Os estudos em campo permitirão avaliar o desempenho do EP em diferentes tipos de solo, condições climáticas e culturas, fornecendo dados essenciais para sua aplicação prática em sistemas agrícolas.

Além disso, é fundamental aprofundar o estudo da viabilidade econômica e ambiental do uso do EP juntamente a ureia em grande escala. Avaliar os custos de aplicação, o impacto nas práticas agrícolas e a economia no fertilizante são aspectos essenciais para entender a sustentabilidade e a adoção generalizada dessa abordagem. A combinação de ensaios de campo e análises econômicas e ambientais fornecerá informações cruciais para direcionar o desenvolvimento de estratégias que promovam a utilização eficiente e responsável do EP como inibidor de urease, contribuindo assim para um manejo agrícola mais eficiente e sustentável.

REFERÊNCIAS

- ABD-EL-KAREEM, Farid. Effect of acetic acid fumigation on soil-borne fungi and cucumber root rot disease under greenhouse conditions. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, vol. 42, n° 3, p. 213–220, 2009. <https://doi.org/10.1080/03235400600999380>.
- ABENAVOLI, M. R.; CACCO, G.; SORGONÀ, A.; MARABOTTINI, R.; PAOLACCI, A. R.; CIAFFI, M.; BADIANI, M. The inhibitory effects of coumarin on the germination of durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. durum, CV. Simeto) seeds. **Journal of Chemical Ecology**, vol. 32, n° 2, p. 489–506, 2006. <https://doi.org/10.1007/s10886-005-9011-x>.
- ABOUZIENA, Hussein F. H.; OMAR, Ahmad A. M.; SHARMA, Shiv D.; SINGH, Megh. Efficacy Comparison of Some New Natural-Product Herbicides for Weed Control at Two Growth Stages. **Weed Technology**, vol. 23, n° 3, p. 431–437, 2009. <https://doi.org/10.1614/wt-08-185.1>.
- AL-HAJ IBRAHIM, Hassan. Introductory Chapter: Pyrolysis. **Recent Advances in Pyrolysis**. [S. l.]: IntechOpen, 2020. <https://doi.org/10.5772/intechopen.90366>.
- ALI, Sofi Imtiyaz; VENUGOPALAN, Venkatesalu. Mosquito larvicidal potential of hydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-one (MALTOL) isolated from the methanol root extract of *Senecio laetus* Edgew. and its in-silico study. **Natural Product Research**, , p. 1–5, 2019. DOI 10.1080/14786419.2019.1634712. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1634712>.
- AREMU, Adeyemi O.; BAIRU, Michael W.; FINNIE, Jeffrey F.; VAN STADEN, Johannes. Stimulatory role of smoke-water and karrikinolide on the photosynthetic pigment and phenolic contents of micropropagated “Williams” bananas. **Plant Growth Regulation**, vol. 67, n° 3, p. 271–279, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10725-012-9685-3>.
- ARORA, Richa; ISSAR, Upasana; KAKKAR, Rita. In Silico study of the active site of *Helicobacter pylori* urease and its inhibition by hydroxamic acids. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, vol. 83, p. 64–73, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2018.04.018>.
- BAKER, C. J.; O’NEILL, Nichole R.; DEAHL, Kenneth; LYDON, John. Continuous production of extracellular antioxidants in suspension cells attenuates the oxidative burst detected in plant microbe interactions. **Plant Physiology and Biochemistry**, vol. 40, n° 6–8, p. 641–644, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(02\)01413-4](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01413-4).
- BAKER, C. Jacyn; MOCK, Norton M.; WHITAKER, Bruce D.; ROBERTS, Daniel P.; RICE, Clifford P.; DEAHL, Kenneth L.; AVER’YANOV, Andrey A. Involvement of acetosyringone in plant-pathogen recognition. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 328, n° 1, p. 130–136, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.12.153>.
- BANEL, Anna; ZYGMUNT, Bogdan. Application of gas chromatography-mass spectrometry preceded by solvent extraction to determine volatile fatty acids in wastewater of municipal,

animal farm and landfill origin. **Water Science and Technology**, vol. 63, n° 4, p. 590–597, 2011. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.204>.

BAZIRAMAKENGA, R.; SIMARD, R. R. Low Molecular Weight Aliphatic Acid Contents of Composted Manures. **Journal of Environmental Quality**, vol. 27, n° 3, p. 557–561, 1998. <https://doi.org/10.2134/jeq1998.00472425002700030012x>.

BEMILLER, James N. Chapter 10. Carbohydrate Analysis. In: NIELSEN, S.S. (org.). **Food Analysis**. [S. l.: s. n.], 2010. p. 147–177. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1478-1_10.

BENINI, Stefano; RYPNIEWSKI, Wojciech R.; WILSON, Keith S.; MILETTI, Silvia; CIURLI, Stefano; MANGANI, Stefano. A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: Why urea hydrolysis costs two nickels. **Structure**, vol. 7, n° 2, p. 205–216, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(99\)80026-4](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(99)80026-4).

BENITES, Vinicius M; MADARI, Beáta; LUIZ DE A MACHADO, Pedro O. Extração e Fracionamento Quantitativo de Substâncias Húmicas do Solo: um Procedimento Simplificado de Baixo Custo Técnico Comunicado Introdução. 2003. .

BENZON, Hiyasmin Rose L.; LEE, Sang Chul. Potential of Wood Vinegar in Enhancing Fruit Yield and Antioxidant Capacity in Tomato. **Korean Journal of Plant Resources**, vol. 29, n° 6, p. 704–711, 2016. <https://doi.org/10.7732/kjpr.2016.29.6.704>.

BENZON, Hiyasmin Rose L.; LEE, Sang Chul. Pyroligneous Acids Enhance Phytoremediation of Heavy Metal-Contaminated Soils Using Mustard. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, vol. 48, n° 17, p. 2061–2073, 2017. <https://doi.org/10.1080/00103624.2017.1406102>.

BERENDSEN, H.J.C.; VAN DER SPOEL, D.; VAN DRUNEN, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer Physics Communications**, vol. 91, n° 1–3, p. 43–56, set. 1995. [https://doi.org/10.1016/0010-4655\(95\)00042-E](https://doi.org/10.1016/0010-4655(95)00042-E).

BERNSTEIN, Frances C.; KOETZLE, Thomas F.; WILLIAMS, Grahame J.B.; MEYER, Edgar F.; BRICE, Michael D.; RODGERS, John R.; KENNARD, Olga; SHIMANOUCHI, Takehiko; TASUMI, Mitsuo. The protein data bank: A computer-based archival file for macromolecular structures. **Journal of Molecular Biology**, vol. 112, n° 3, p. 535–542, maio 1977. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(77\)80200-3](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(77)80200-3).

BOUCHER, C.; MEETS, M. Determination of the relative activity of aqueous plant-derived smoke solutions used in seed germination. **South African Journal of Botany**, vol. 70, n° 2, p. 313–318, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(15\)30252-0](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(15)30252-0).

BOUNTAGKIDOU, Olga G.; ORDOUDI, Stella A.; TSIMIDOU, Maria Z. Structure-antioxidant activity relationship study of natural hydroxybenzaldehydes using in vitro assays. **Food Research International**, vol. 43, n° 8, p. 2014–2019, out. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.05.021>.

BRAGA, Taniris Cafiero; SILVA, Thamara Ferreira; MACIEL, Thamilla Maria Silva; DA SILVA, Edjan Carlos Dantas; DA SILVA-JÚNIOR, Edeildo Ferreira; MODOLO, Luzia Valentina; FIGUEIREDO, Isis Martins; SANTOS, Josué Carinhanha Caldas; DE AQUINO, Thiago Mendonça; DE FÁTIMA, Ângelo. Ionic liquid-assisted synthesis of dihydropyrimidin(thi)one Biginelli adducts and investigation of their mechanism of urease inhibition. **New Journal of Chemistry**, vol. 43, nº 38, p. 15187–15200, 2019. <https://doi.org/10.1039/C9NJ03556G>.

BRASIL. **Plano Nacional de Fertilizantes 2050 - Uma Estratégia para os Fertilizantes no Brasil**. Brasília, DF: [s. n.], nov. 2021.

BREMNER, J. M.; DOUGLAS, L. A. Inhibition of urease activity in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, vol. 3, nº 4, p. 297–307, 1971. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(71\)90039-3](https://doi.org/10.1016/0038-0717(71)90039-3).

BURGER, B. V.; POŠTA, M.; LIGHT, M. E.; KULKARNI, M. G.; VIVIERS, M. Z.; VAN STADEN, J. More butenolides from plant-derived smoke with germination inhibitory activity against karrikinolide. **South African Journal of Botany**, vol. 115, p. 256–263, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.01.023>.

CAMPOS, Ângela Diniz. **Circular 177 - Informação Técnica sobre Extrato Pirolenhoso**. Pelotas, RS: [s. n.], 2018a.

CAMPOS, Ângela Diniz. **Processo de Coleta e Produção do Extrato Pirolenhoso para Uso Agrícola**. [S. l.: s. n.], 2018b.

CAMPOS, Ângela Diniz. **Técnicas para Produção de Extrato Pirolenhoso para Uso Agrícola**. [S. l.: s. n.], 2007.

CÂNDIDO, Núbia Rangel; PASA, Vânia Márcia Duarte; VILELA, Adriana de Oliveira; CAMPOS, Ângela Diniz; DE FÁTIMA, Ângelo; MODOLO, Luzia Valentina. Understanding the multifunctionality of pyroligneous acid from waste biomass and the potential applications in agriculture. **Science of the Total Environment**, vol. 881, 10 jul. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163519>.

CARY, R.; DOBSON, S.; GREGG, N. Concise International Chemical Assessment Document 21: 2-Furaldehyde. **IPCS Concise International Chemical Assessment Documents**, nº 21, 2000. .

CGEE. **Modernização da produção de carvão vegetal no Brasil: Subsídios para revisão do Plano Siderurgia**. Brasília, DF: [s. n.], 2015. Disponível em: www.cgee.org.br.

CHEN, Shilin; DONG, Linlin; XU, Jiang;; LI, Xiwen. **Fusarium oxysporum fungicide and application of 2,6-dimethoxyphenol**. China: [s. n.], 2016.

CHEN, Ying Xu; HUANG, Xiang Dong; HAN, Zhi Ying; HUANG, Xiao; HU, Bin; SHI, De Zhi; WU, Wei Xiang. Effects of bamboo charcoal and bamboo vinegar on nitrogen conservation and heavy metals immobility during pig manure composting. **Chemosphere**, vol. 78, nº 9, p. 1177–1181, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.12.029>.

CHEN, Yu Hang; LI, Yi Fan; WEI, Huan; LI, Xiao Xia; ZHENG, Huai Tang; DONG, Xin Yi; XU, Teng Fei; MENG, Jiang Fei. Inhibition efficiency of wood vinegar on grey mould of table grapes. **Food Bioscience**, vol. 38, n° 100755, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100755>.

CHENG, Hu; WANG, Zi Quan; ZHOU, Kun; QIAN, Shuang; BIAN, Yong Rong; HE, Wen Xiang; LÜ, Jia Long. Effects of pyroligneous acid on quantity of microorganism and enzyme activity in alkaline soil. **Zhongguo Huanjing Kexue/China Environmental Science**, vol. 37, n° 2, p. 696–701, 2017. .

CHOI, J. Y.; SHINDE, P. L.; KWON, I. K.; SONG, Y. H.; CHAE, B. J. Effect of wood vinegar on the performance, nutrient digestibility and intestinal microflora in weanling pigs. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, vol. 22, n° 2, p. 267–274, 2009.
<https://doi.org/10.5713/ajas.2009.80355>.

CHU, Gyo Moon; JUNG, Cheol Kyu; KIM, Hoi Yun; HA, Ji Hee; KIM, Jong Hyun; JUNG, Min Seob; LEE, Shin Ja; SONG, Yuno; IBRAHIM, Rashid Ismael Hag; CHO, Jae Hyeon; LEE, Sung Sill; SONG, Young Min. Effects of bamboo charcoal and bamboo vinegar as antibiotic alternatives on growth performance, immune responses and fecal microflora population in fattening pigs. **Animal Science Journal**, vol. 84, n° 2, p. 113–120, 2013.
<https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2012.01045.x>.

CORREIA, Dayana da Silva; SANTOS, Flávia Hermelina da Rocha; SOARES, Luis Henrique de Barros; CORREIA, Maria Elizabeth Fernandes. Enzimas oxidativas microbianas envolvidas na biodegradação da lignocelulose: produção, características bioquímicas e importância biotecnológica. **Embrapa Agrobiologia. Documentos**, 284, p. 34, 2011. .

CSIZMADIA, Péter. MarvinSketch and MarvinView: Molecule Applets for the World Wide Web. 1 nov. 1999. **Proceedings of The 3rd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry** [...]. Basel, Switzerland: MDPI, 1 nov. 1999. p. 1775.
<https://doi.org/10.3390/ecsoc-3-01775>.

DAKORA, Felix D.; PHILLIPS, Donald A. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. **Plant and Soil**, vol. 245, n° 1, p. 35–47, 2002.
<https://doi.org/10.1023/A:1020809400075>.

DE LANGE, J.H.; BOUCHER, C. Autecological studies on Audouinia capitata (Bruniaceae). I. Plant-derived smoke as a seed germination cue. **South African Journal of Botany**, vol. 56, n° 6, p. 700–703, 1990. [https://doi.org/10.1016/s0254-6299\(16\)31009-2](https://doi.org/10.1016/s0254-6299(16)31009-2).

DIEBOLD, J P. A review of the chemical and physical mechanisms of the storage stability of fast pyrolysis bio-oils. n° January, 1999. <https://doi.org/10.2172/753818>.

DISSATIAN, Atchima; SANITCHON, Jirawat; PONGDONTRI, Paweena; JONGRUNGKLANG, Nuntawoot; JOTHITYANGKON, Darunee. Potential of Wood Vinegar for Enhancing Seed Germination of Three Upland Rice Varieties by Suppressing Malondialdehyde Production. **AGRIVITA Journal of Agricultural Science**, vol. 40, n° 2, p. 371–380, 2018.

DOU, Lei; KOMATSUZAKI, Masakazu; NAKAGAWA, Mitsuhiro. Effects of Biochar, Mokusakueki and Bokashi application on soil nutrients, yields and qualities of sweet potato. **International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science**, vol. 2, nº 8, p. 318–327, 2012.

DU, H.G.; MORI, E.; TERAOKA, H.; TSUZUKI, E. Effect of the mixture of charcoal with pyroligneous acid on shoot and root growth of sweet potato. **Jpn. J. Crop Sci.**, vol. 67, nº 2, p. 149–152, 1998. .

DU JARDIN, Patrick. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. **Scientia Horticulturae**, vol. 196, p. 3–14, 2015. DOI 10.1016/j.scienta.2015.09.021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>.

EL-MOUGY, N S; ABDEL-KADER, M M. Seed and Soil Treatments as Integrated Control Measure Against Faba Bean Root Rot Pathogens. **Plant Pathology Bulletin**, vol. 18, p. 75–87, 2009. .

EL-MOUGY, Nehal S.; EL-GAMAL, Nadia G.; MOHAMED, Moawad M.M.; ABDEL-KADER, Mokhtar M. Furfural Approaches as Control Measures against Root Rot and Root-Knot Incidence of Tomato under Greenhouse and Field Conditions. **Journal of Plant Protection Research**, 2008. <https://doi.org/10.2478/v10045-008-0010-0>.

EMBRAPA. Beneficiamento da casca de coco verde para a produção de fibra e pó. 2004. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/33/beneficiamento-da-casca-de-coco-verde-para-a-producao-de-fibra-e-po>. Acessado em: 28 nov. 2022.

EMBRAPA. **Manual de Métodos de Análise de Solo da Embrapa** (Paulo César Teixeira, Guilherme Kangussu Donagemma, Ademir Fontana, & Wenceslau Geraldes Teixeira, orgs.). Brasília, DF: [s. n.], 2017. Disponível em: <https://www.embrapa.br>.

EMBRAPA. **Visão 2030 - o futuro da agricultura brasileira**. Brasília, DF: Embrapa: [s. n.], 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/visao-de-futuro>. Acessado em: 9 abr. 2023.

EPSTEIN, E. **Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives**. New York: Wiley, 1972.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Statistics - DATABASE - Forestry Production and Trade (Forestry): Wood charcoal. 2020. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/FO>. Acessado em: 16 mar. 2020.

FAQUIN, Valdemar. **Nutrição Mineral de Plantas**. Lavras: UFLA / FAEPE: Curso de Pós-Graduação “Lato Sensu” (Especialização) a Distância: Solos e Meio Ambiente, 2005.

FENGEL, Dietrich; WEGENER, Gerd. **Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions**. [S. l.: s. n.], 2011. <https://doi.org/10.1515/9783110839654>.

FLEMATTI, Gavin R.; GHISALBERTI, Emilio L.; DIXON, Kingsley W.; TRENGOVE, Robert D. A compound from smoke that promotes seed germination. **Science**, vol. 305, n° 5686, p. 977, 2004. <https://doi.org/10.1126/science.1099944>.

FLEMATTI, Gavin R.; GHISALBERTI, Emilio L.; DIXON, Kingsley W.; TRENGOVE, Robert D. Identification of alkyl substituted 2H-furo[2,3-c]pyran-2-ones as germination stimulants present in smoke. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 57, n° 20, p. 9475–9480, 2009. <https://doi.org/10.1021/jf9028128>.

GAO, Tao; BIAN, Rongjun; JOSEPH, Stephen; TAHERYMOOSAVI, Sarasadat; MITCHELL, David R.G.; MUNROE, Paul; XU, Jianhong; SHI, Jianrong. Wheat straw vinegar: A more cost-effective solution than chemical fungicides for sustainable wheat plant protection. **Science of the Total Environment**, vol. 725, p. 138359, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138359>.

GODDARD, Thomas D.; HUANG, Conrad C.; FERRIN, Thomas E. Software Extensions to UCSF Chimera for Interactive Visualization of Large Molecular Assemblies. **Structure**, vol. 13, n° 3, p. 473–482, mar. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.str.2005.01.006>.

GRACE HOME. [s. d.]. Disponível em: <https://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>. Acessado em: 2 jun. 2021.

GREWAL, Arshdeep; ABBEY, Lord; GUNUPURU, Lokanadha Rao. Production, prospects and potential application of pyroligneous acid in agriculture. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, vol. 135, n° August, p. 152–159, 2018. DOI 10.1016/j.jaap.2018.09.008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2018.09.008>.

GUIMARÃES, Gelton G.F.; PAIVA, Diogo M.; CANTARUTTI, Reinaldo B.; MATTIELLO, Edson M.; REIS, Efraim L. Volatilization of ammonia originating from urea treated with oxidized charcoal. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, vol. 26, n° 9, p. 1928–1935, 2015. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150171>.

GUO, Nan; LI, Caina; LIU, Quan; LIU, Shuainan; HUAN, Yi; WANG, Xing; BAI, Guoliang; YANG, Miaomiao; SUN, Sujuan; XU, Caimin; SHEN, Zhufang. Maltol, a food flavor enhancer, attenuates diabetic peripheral neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. **Food and Function**, vol. 9, n° 12, p. 6287–6297, 2018. <https://doi.org/10.1039/c8fo01964a>.

HAGNER, M.; KUOPPALA, E.; FAGERNÄS, L.; TIILIKKALA, K.; SETÄLÄ, H. Using the copse snail *Arianta arbustorum* (Linnaeus) to detect repellent compounds and the quality of wood vinegar. **International Journal of Environmental Research**, vol. 9, n° 1, p. 53–60, 2015. .

HAGNER, Marleena. **Potential of the slow pyrolysis products birch tar oil, wood vinegar and biochar in sustainable plant protection - pesticidal effects, soil improvement and environmental risks**. 2013. 1–42 f. Academic Dissertation in Environmental Ecology – Faculty of Biological and Environmental Sciences of the University of Helsinki, 2013.

HAGNER, Marleena; LINDQVIST, Bengt; VEPSÄLÄINEN, Jouko; SAMORÌ, Chiara; KESKINEN, Riikka; RASA, Kimmo; HYVÖNEN, Terho. Potential of pyrolysis liquids to

control the environmental weed *Heracleum mantegazzianum*. **Environmental Technology and Innovation**, vol. 20, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101154>.

HAGNER, Marleena; TIILIKKALA, Kari; LINDQVIST, Isa; NIEMELÄ, Klaus; WIKBERG, Hanne; KÄLLI, Anssi; RASA, Kimmo. Performance of Liquids from Slow Pyrolysis and Hydrothermal Carbonization in Plant Protection. **Waste and Biomass Valorization**, vol. 11, n° 3, p. 1005–1016, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-00545-1>.

HALPERN, Moshe; BAR-TAL, Asher; OFEK, Maya; MINZ, Dror; MULLER, Torsten; YERMIYAHU, Uri. The Use of Biostimulants for Enhancing Nutrient Uptake. **Advances in Agronomy**, vol. 130, n° January 2016, p. 141–174, 2015. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2014.10.001>.

HIGASHINO, Takaaki; SHIBATA, Akira; YATAGAI, Mitsuyoshi. Basic Study for Establishing Specifications for Wood Vinegar by distillation I. Study of regulations and reproducibility of compounds contained in distilled wood vinegar. **Mokuzai Gakkaishi**, vol. 51, n° 3, p. 180–188, 2005. <https://doi.org/10.2488/jwrs.51.180>.

HO, Chen Lung; LIN, Chai Yi; KA, Shuk Man; CHEN, Ann; TASI, Yu Ling; LIU, May Lan; CHIU, Yi Chieh; HUA, Kuo Feng. Bamboo Vinegar Decreases Inflammatory Mediator Expression and NLRP3 Inflammasome Activation by Inhibiting Reactive Oxygen Species Generation and Protein Kinase C- α/δ Activation. **PLoS ONE**, vol. 8, n° 10, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075738>.

HUANG, Jamin; PUTNAM, Alan R.; WERNER, Georgina M.; MISHRA, Saroj K.; WHITENACK, Curt. Herbicidal Metabolites from a Soil-Dwelling Fungus (*Scopulariopsis brumptii*) . **Weed Science**, 1989. <https://doi.org/10.1017/s004317450005596x>.

IBGE. **Produção da extração vegetal e da silvicultura**. Rio de Janeiro: [s. n.], 2021.

ICHIKAWA, Tadashi; TOMIOKA, Hiromi; SHIRAKAWA, Norio;; IWANE, Yoshitaka. **Phenol derivatives as plant growth regulators**. Japão: [s. n.], 1979.

IDRIS, Mukhtar Oluwaseun; YEKEEN, Abieb Abiodun; ALAKANSE, Oluwaseun Suleiman; DUROJAYE, Olanrewaju Ayodeji. Computer-aided screening for potential TMPRSS2 inhibitors: a combination of pharmacophore modeling, molecular docking and molecular dynamics simulation approaches. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, , p. 1–19, 16 jul. 2020. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1792346>.

IFASTAT. International Fertilizer Association DATABASE: Consumption. 2017. .

INGLE, Robert A. Histidine Biosynthesis. **The Arabidopsis Book**, vol. 9, p. e0141, jan. 2011. <https://doi.org/10.1199/tab.0141>.

JÄGER, A. K.; RABE, T.; VAN STADEN, J. Food-flavouring smoke extracts promote seed germination. **South African Journal of Botany**, vol. 62, n° 5, p. 282–284, 1996. [https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(15\)30659-1](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(15)30659-1).

JAMIL, Muhammad; KANWAL, Mamoon; ASLAM, Muhammad Mudasar; KHAN, Shakir Ullah; MALOOK, Ijaz; TU, Jumin; REHMAN, Shafiq ur. Effect of plant-derived smoke priming on physiological and biochemical characteristics of rice under salt stress condition. **Australian Journal of Crop Science**, vol. 8, n° 2, p. 159–170, 2014. .

JAPAN WOOD VINEGAR ASSOCIATION. Japan Wood Vinegar Association official site. 2020. Disponível em: <http://www.nihonmokusaku.jp/>. Acessado em: 20 out. 2020.

JOTHITYANGKOON, Darunee; SUNGWAL, Sirasa; PHUNTSHO, Tashi; WANAPAT, Sadudee; POLTHANEE, Anan; RESOURCES, Agricultural. Wood vinegar increases yield of direct seeding rice when used as priming agent and foliar application. 2009. .

JOTHITYANGKOON, Darunee; WANAPAT, Sadudee; POLTHANEE, Anan. Using wood vinegar as priming agent and foliar application in direct seeding rice : Tested by farmers. **KHON KAEN AGR. J.**, p. 233–240, 2012. .

JUN, Mu; ZHI-MING, Yu; WEN-QIANG, Wu; WU QING-LI. Preliminary study of application effect of bamboo vinegar on vegetable growth. **Forestry Studies in China**, vol. 8, n° 3, p. 43–47, 2006. <https://doi.org/10.1007/s11632-006-0023-6>.

KAFARSKI, Paweł; TALMA, Michał. Recent advances in design of new urease inhibitors: A review. **Journal of Advanced Research**, vol. 13, p. 101–112, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.01.007>.

KAMRAN, Muhammad; KHAN, Abdul L.; ALI, Liaqat; HUSSAIN, Javid; WAQAS, Muhammad; AL-HARRASI, Ahmed; IMRAN, Qari M.; KIM, Yoon-Ha; KANG, Sang-Mo; YUN, Byung-Wook; LEE, In-Jung. Hydroquinone; A Novel Bioactive Compound from Plant-Derived Smoke Can Cue Seed Germination of Lettuce. **Frontiers in Chemistry**, vol. 5, n° May, p. 1–8, 2017. <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00030>.

KIARIE-MAKARA, Martha W.; YOON, Hae-Soon; LEE, Dong-Kyu. Repellent efficacy of wood vinegar against *Culex pipiens pallens* and *Aedes togoi* (Diptera: Culicidae) under laboratory and semi-field conditions . **Entomological Research**, vol. 40, n° 2, p. 97–103, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5967.2010.00265.x>.

KIM, Jong Myong; TO, Taiko Kim; MATSUI, Akihiro; TANOI, Keitaro; KOBAYASHI, Natsuko I.; MATSUDA, Fumio; HABU, Yoshiki; OGAWA, Daisuke; SAKAMOTO, Takuya; MATSUNAGA, Sachihiro; BASHIR, Khurram; RASHEED, Sultana; ANDO, Marina; TAKEDA, Hiroko; KAWAURA, Kanako; KUSANO, Miyako; FUKUSHIMA, Atsushi; ENDO, Takaho A.; KUROMORI, Takashi; ... SEKI, Motoaki. Acetate-mediated novel survival strategy against drought in plants. **Nature Plants**, vol. 3, n° June, p. 4–10, 2017. <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.97>.

KIM, MK; PARK, HJ; LIM, SU. Study on the value of pyroligneous acids as organic fertilizer. **Daesan Nonchong**, vol. 8, p. 279–295, 2000.

KOOK, K; JEONG, J H; KIM, K H. The Effects of Supplemental Levels of Bamboo Vinegar Liquids on Growth Performance, Serum Profile, Carcass Grade, and Meat Quality

Characteristics in Finishing Pigs. **Journal of Animal Science and Technology**, vol. 47, n° 5, p. 721–730, 2005. <https://doi.org/10.5187/jast.2005.47.5.721>.

KUMAR, Ankur; LIANG, Brooke; AARTHY, Murali; SINGH, Sanjeev Kumar; GARG, Neha; MYSOREKAR, Indira U.; GIRI, Rajanish. Hydroxychloroquine Inhibits Zika Virus NS2B-NS3 Protease. **ACS Omega**, vol. 3, n° 12, p. 18132–18141, 31 dez. 2018. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b01002>.

LEE, Joo Kyung; PARK, Hyun Jun; CHA, Seung Ju; KWON, Seon Ju; PARK, Jin Hee. Effect of pyroligneous acid on soil urease, amidase, and nitrogen use efficiency by Chinese cabbage (*Brassica campestris* var. *Pekinensis*). **Environmental Pollution**, vol. 291, n° August, p. 118132, 2021. DOI 10.1016/j.envpol.2021.118132. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118132>.

LI, Ruibo; NARITA, Ryo; NISHIMURA, Hiroshi; MARUMOTO, Shinsuke; YAMAMOTO, Seiji P.; OUDA, Ryota; YATAGAI, Mitsuyoshi; FUJITA, Takashi; WATANABE, Takashi. Antiviral Activity of Phenolic Derivatives in Pyroligneous Acid from Hardwood, Softwood, and Bamboo. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, vol. 6, n° 1, p. 119–126, 2018. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b01265>.

LI, Yong; LI, Xifeng; SON, Byeng Wha. Antibacterial and radical scavenging epoxycyclohexenones and aromatic polyols from a marine isolate of the fungus *Aspergillus*. **Natural Product Sciences**, vol. 11, n° 3, p. 136–138, 2005. .

LI, Zhanchao; ZHANG, Lening; CHEN, Guanyu; WU, Lijie; LIU, Boyang; LI, Yue; SUN, Shuang; ZHANG, Hanqi; ZHANG, Zhiquan; WANG, Ziming. A new method for comprehensive utilization of wood vinegar by distillation and liquid–liquid extraction. **Process Biochemistry**, vol. 75, p. 194–201, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.08.012>.

LI, Zhanchao; ZHANG, Zhiquan; WU, Lijie; ZHANG, Hanqi; WANG, Ziming. Characterization of Five Kinds of Wood Vinegar Obtained from Agricultural and Forestry Wastes and Identification of Major Antioxidants in Wood Vinegar. **Chemical Research in Chinese Universities**, vol. 35, n° 1, p. 12–20, 2019. <https://doi.org/10.1007/s40242-019-8207-5>.

LIGHT, Marnie E.; BURGER, Ben V.; STAERK, Dan; KOHOUT, Ladislav; VAN STADEN, Johannes. Butenolides from plant-derived smoke: natural plant-growth regulators with antagonistic actions on seed germination. **Journal of Natural Products**, vol. 73, n° 2, p. 267–269, 2010. <https://doi.org/10.1021/np900630w>.

LILL, Markus A.; DANIELSON, Matthew L. Computer-aided drug design platform using PyMOL. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, vol. 25, n° 1, p. 13–19, 30 jan. 2011. <https://doi.org/10.1007/s10822-010-9395-8>.

LING, Zhou; ENCHEN, Jiang; BOSONG, L I. Effect of Wood Vinegar on Seed Germination and Water Implantation of Corn. **Journal of Northeast Aricultural University**, n° 2, p. 6–11, 2009. .

LINGBECK, Jody M.; CORDERO, Paola; O'BRYAN, Corliss A.; JOHNSON, Michael G.; RICKE, Steven C.; CRANDALL, Philip G. Functionality of liquid smoke as an all-natural antimicrobial in food preservation. **Meat Science**, vol. 97, n° 2, p. 197–206, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.02.003>.

LIU, Ling; GUO, Xiaoping; WANG, Shuqi; LI, Lei; ZENG, Yang; LIU, Guanhong. Effects of wood vinegar on properties and mechanism of heavy metal competitive adsorption on secondary fermentation based composts. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 150, n° 35, p. 270–279, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.037>.

LIU, Shuangli; WANG, Xiaohui; YIN, Xinhua; SAVOY, Hubert J.; MCCLURE, Angela; ESSINGTON, Michael E. Ammonia Volatilization Loss and Corn Nitrogen Nutrition and Productivity with Efficiency Enhanced UAN and Urea under No-tillage. **Scientific Reports**, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42912-5>.

LU, Haifei; LASHARI, Muhammad Siddique; LIU, Xiaoyu; JI, Haishi; LI, Lianqing; ZHENG, Jufeng; KIBUE, Grace Wanjiru; JOSEPH, Stephen; PAN, Genxing. Changes in soil microbial community structure and enzyme activity with amendment of biochar-manure compost and pyroligneous solution in a saline soil from Central China. **European Journal of Soil Biology**, vol. 70, p. 67–76, 2015. DOI 10.1016/j.ejsobi.2015.07.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2015.07.005>.

LU, Xincheng; JIANG, Jianchun; HE, Jing; SUN, Kang; SUN, Yunjuan. Effect of Pyrolysis Temperature on the Characteristics of Wood Vinegar Derived from Chinese Fir Waste: A Comprehensive Study on Its Growth Regulation Performance and Mechanism. **ACS Omega**, vol. 4, p. 19054–19062, 2019. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02240>.

LUPOI, Jason S.; SINGH, Seema; DAVIS, Mark; LEE, David J.; SHEPHERD, Merv; SIMMONS, Blake A.; HENRY, Robert J. High-throughput prediction of eucalypt lignin syringyl/guaiacyl content using multivariate analysis: A comparison between mid-infrared, near-infrared, and Raman spectroscopies for model development. **Biotechnology for Biofuels**, vol. 7, n° 1, 2014. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-93>.

MA, Xihan; WEI, Qin; ZHANG, Shanshan; SHI, Lin; ZHAO, Zhong. Isolation and bioactivities of organic acids and phenols from walnut shell pyroligneous acid. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, vol. 91, n° 2, p. 338–343, 2011. DOI 10.1016/j.jaap.2011.03.009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaap.2011.03.009>.

MACEGONIUK, Katarzyna; KOWALCZYK, Rafał; RUDZIŃSKA, Anna; PSURSKI, Mateusz; WIETRZYK, Joanna; BERLICKI, Łukasz. Potent covalent inhibitors of bacterial urease identified by activity-reactivity profiling. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.02.022>.

MAHMUD, Khoirun Nisa; YAHAYU, Maizatulkamal; SARIP, Siti Hajar Md; RIZAN, Nurul Husna; MIN, Chai Bing; MUSTAFA, Nurul Farhana; NGADIRAN, Sulaiman; UJANG, Salmiah; ZAKARIA, Zainul Akmar. Evaluation on efficiency of pyroligneous acid from palm kernel shell as antifungal and solid pineapple biomass as antibacterial and plant growth promoter. **Sains Malaysiana**, vol. 45, n° 10, p. 1423–1434, 2016. .

MAPA. **Manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes e corretivos**. Brasília, DF: [s. n.], 2017. Disponível em: www.agricultura.gov.br.

MATHEW, Sindhu; ZAKARIA, Zainul Akmar. Pyroligneous acid—the smoky acidic liquid from plant biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 99, n° 2, p. 611–622, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6242-1>.

MATTOS, C.; VELOSO, M. C.C.; ROMEIRO, G. A.; FOLLY, E. Biocidal applications trends of bio-oils from pyrolysis: Characterization of several conditions and biomass, a review. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, vol. 139, n° December 2018, p. 1–12, 2019. DOI 10.1016/j.jaap.2018.12.029. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2018.12.029>.

MAZZEI, L.; CIANCI, M.; MUSIANI, F.; CIURLI, S. Inactivation of urease by 1,4-benzoquinone: Chemistry at the protein surface. **Dalton Transactions**, vol. 45, n° 13, p. 5455–5459, 2016. <https://doi.org/10.1039/c6dt00652c>.

MAZZEI, Luca; CIANCI, Michele; MUSIANI, Francesco; LENTE, Gábor; PALOMBO, Marta; CIURLI, Stefano. Inactivation of urease by catechol: Kinetics and structure. **Journal of Inorganic Biochemistry**, vol. 166, p. 182–189, 2017a. DOI 10.1016/j.jinorgbio.2016.11.016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.11.016>.

MAZZEI, Luca; CIANCI, Michele; MUSIANI, Francesco; LENTE, Gábor; PALOMBO, Marta; CIURLI, Stefano. Inactivation of urease by catechol: Kinetics and structure. **Journal of Inorganic Biochemistry**, vol. 166, p. 182–189, jan. 2017b. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.11.016>.

MISRA, G.; PATNAIK, S. N. Effect of coumarin on the germination and growth of rice seedlings. **Nature**, vol. 183, n° 4666, p. 989–990, 1959. <https://doi.org/10.1038/183989b0>.

MODOLO, Luzia v.; DA-SILVA, Cristiane J.; BRANDÃO, Débora S.; CHAVES, Izabel S. A minireview on what we have learned about urease inhibitors of agricultural interest since mid-2000s. **Journal of Advanced Research**, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.04.001>.

MOHAN, Dinesh; PITTMAN, Charles U.; STEELE, Philip H. Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: A critical review. **Energy and Fuels**, vol. 20, n° 3, p. 848–889, 2006. <https://doi.org/10.1021/ef0502397>.

MOJIRI, Amin; ZHOU, John L.; OHASHI, Akiyoshi; OZAKI, Noriatsu; KINDAICHI, Tomonori. Comprehensive review of polycyclic aromatic hydrocarbons in water sources, their effects and treatments. **Science of the Total Environment**, vol. 696, p. 133971, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133971>.

MUN, Sung Phil; KU, Chang Sub. Pyrolysis GC-MS analysis of tars formed during the aging of wood and bamboo crude vinegars. **Journal of Wood Science**, vol. 56, n° 1, p. 47–52, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10086-009-1054-0>.

MUNGKUNKAMCHAO, Tuntika; KESMALA, Thawan; PIMRATCH, Sumran; TOOMSAN, Banyong; JOTHITYANGKOON, Darunee. Wood vinegar and fermented bioextracts: Natural products to enhance growth and yield of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Scientia Horticulturae**, vol. 154, p. 66–72, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.02.020>.

NORDLANDER, Ebbe; CARLSSON, Hkan. Computational modeling of the mechanism of urease. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, vol. 2010, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/364891>.

NOROOZLO, Yaghoub Aghaye; SOURI, Mohammad Kazem; DELSHAD, Mojtaba. Stimulation Effects of Foliar Applied Glycine and Glutamine Amino Acids on Lettuce Growth. **Open Agriculture**, vol. 4, n° 1, p. 164–172, 2019. <https://doi.org/10.1515/opag-2019-0016>.

NTALLI, Nikoletta G.; VARGIU, Simona; MENKISSOGLU-SPIROUDI, Urania; CABONI, Pierluigi. Nematicidal carboxylic acids and aldehydes from *Melia azedarach* fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 58, n° 21, p. 11390–11394, 2010. <https://doi.org/10.1021/jf1025345>.

OASMAA, Anja; KUOPPALA, Eeva. Solvent fractionation method with Brix for rapid characterization of wood fast pyrolysis liquids. **Energy and Fuels**, vol. 22, n° 6, p. 4245–4248, 2008. <https://doi.org/10.1021/ef800407d>.

ODA, Akifumi; OKAYASU, Megumi; KAMIYAMA, Yukiko; YOSHIDA, Tomoki; TAKAHASHI, Ohgi; MATSUZAKI, Hisao. Evaluation of Docking Accuracy and Investigations of Roles of Parameters and Each Term in Scoring Functions for Protein–Ligand Docking Using ArgusLab Software. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, vol. 80, n° 10, p. 1920–1925, 15 out. 2007. <https://doi.org/10.1246/bcsj.80.1920>.

ONIDAS, Delphine; STACHNIK, Joanna M.; BRUCKER, Sven; KRÄTZIG, Steffen; GERWERT, Klaus. Histidine is involved in coupling proton uptake to electron transfer in photosynthetic proteins. **European Journal of Cell Biology**, vol. 89, n° 12, p. 983–989, dez. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2010.08.007>.

ORSI, Mario. Molecular dynamics simulation of humic substances. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, vol. 1, n° 1, p. 1–14, 2014. <https://doi.org/10.1186/s40538-014-0010-4>.

OTHMER, Donald F.; KATZEN, Raphael. Tar Elimination in Removal of Tar-Forming. **Industrial and Engineering Chemistry**, vol. 35, n° 3, p. 288–296, 1943. <https://doi.org/10.1021/ie50399a006>.

PAGONI, Aikaterini; DALIANI, Theohari; MACEGONIUK, Katarzyna; VASSILIOU, Stamatia; BERLICKI, Łukasz. Catechol-based inhibitors of bacterial urease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, vol. 29, n° 9, p. 1085–1089, maio 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.02.032>.

PAN, Jie; XIAO, Hui; CHENG, Wen-juan; WANG, Li-yan;; LU, Wen-long. Effect of wood vinegar on soil nutrient, tomato yield and quality. **Zhongguo Turang Yu Feiliao**, vol. 2, n° 71, p. 61–64, 2016. .

PANGNAKORN, Udomporn; WATANASORN, Surasak; KUNTHA, Chumpon; CHUENCHOOKLIN, Sombat. Application of wood vinegar to fermented liquid bio-fertilizer for organic agriculture on soybean. **Asian Journal of Food and Agro-Industry**, n° Special Issue, p. 189–196, 2009. .

PARK, Hyun Jun; PARK, Jin Hee. Effect of pyroligneous acids on urease inhibition. **Journal of Applied Biological Chemistry**, vol. 60, n° 2, p. 173–178, 2017. <https://doi.org/10.3839/jabc.2017.028>.

PATWARDHAN, Pushkaraj R.; BROWN, Robert C.; SHANKS, Brent H. Product distribution from the fast pyrolysis of hemicellulose. **ChemSusChem**, vol. 4, n° 5, p. 636–643, 2011. <https://doi.org/10.1002/cssc.201000425>.

PAULILO, Maria Terezinha Silveira; VIANA, Ana Maria; RANDI, Áurea Maria. **Fisiologia Vegetal**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

PECHA, Brennan; GARCIA-PEREZ, Manuel. **Pyrolysis of Lignocellulosic Biomass**. [S. l.]: Anju Dahiya, 2015. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-407909-0.00026-2>.

PICCOLO, A.; PIETRAMELLARA, G.; MBAGWU, J. S.C. Use of humic substances as soil conditioners to increase aggregate stability. **Geoderma**, vol. 75, n° 3–4, p. 267–277, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0016-7061\(96\)00092-4](https://doi.org/10.1016/S0016-7061(96)00092-4).

PIMENTA, Alexandre S.; FASCIOTTI, Maíra; MONTEIRO, Thays V.C.; LIMA, Kássio M.G. Chemical composition of pyroligneous acid obtained from eucalyptus GG100 clone. **Molecules**, vol. 23, n° 2, p. 1–12, 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23020426>.

PONNUSAMY, Vinoth Kumar; NGUYEN, Dinh Duc; DHARMARAJA, Jeyaprakash; SHOBANA, Sutha; BANU, J. Rajesh; SARATALE, Rijuta Ganesh; CHANG, Soon Woong; KUMAR, Gopalakrishnan. A review on lignin structure, pretreatments, fermentation reactions and biorefinery potential. **Bioresource Technology**, vol. 271, n° September 2018, p. 462–472, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.070>.

QU, Huan; HUANG, Yanjie; SHI, Yinghao; LIU, Ying; WU, Shenglong; BAO, Wenbin; QU, Huan; HUANG, Yanjie; SHI, Yinghao; LIU, Ying; WU, Shenglong; QU, Huan. Effect of bamboo vinegar powder as an antibiotic alternative on the digesta bacteria communities of finishing pigs. **Canadian Journal of Microbiology**, vol. 64, n° 10, p. 732–743, 2018. .

RAHMAN, Md Mezanur; MOSTOFA, Mohammad Golam; RAHMAN, Md Abiar; ISLAM, Md Robyul; KEYA, Sanjida Sultana; DAS, Ashim Kumar; MIAH, Md Giashuddin; KAWSER, A. Q.M.Robiul; AHSAN, S. M.; HASHEM, Abeer; TABASSUM, Baby; ABD_ ALLAH, Elsayed Fathi; TRAN, Lam Son Phan. Acetic acid: a cost-effective agent for mitigation of seawater-induced salt toxicity in mung bean. **Scientific Reports**, vol. 9, n° 1, p. 1–15, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51178-w>.

RAHMAN, Mezanur; MOSTOFA, Mohammad Golam; KEYA, Sanjida Sultana; RAHMAN, Abiar; DAS, Ashim Kumar; ISLAM, Robyul; ABDELRAHMAN, Mostafa; BHUIYAN, Shahab Uddin; NAZNIN, Tahia; ANSARY, Mesbah Uddin; TRAN, Lam Son Phan. Acetic acid improves drought acclimation in soybean: an integrative response of photosynthesis, osmoregulation, mineral uptake and antioxidant defense. **Physiologia Plantarum**, vol. 172, n° 2, p. 334–350, 2021. <https://doi.org/10.1111/ppl.13191>.

RAMADEVI, Payyavula; HEGDE, Deepak v.; VARGHESE, Mohan; KAMALAKANNAN, Rathinam; GANAPATHY, Suraj P.; GURUMURTHY, Demlapura S. Evaluation of lignin syringyl/guaiacyl ratio in Eucalyptus camaldulensis across three diverse sites based on near infrared spectroscopic calibration modelling with five Eucalyptus species and its impact on Kraft pulp yield. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, vol. 24, n° 6, p. 529–536, 2016. <https://doi.org/10.1255/jnirs.1251>.

RAMSAY, Kamdem Soup T.; WAFO, Pascal; ALI, Zulfiqar; KHAN, Ajmal; OLUYEMISI, Ogbale O.; MARASINI, Bishnu P.; KHAN, Ikhlal A.; BONAVENTURE, Ngadju T.; CHOUDHARY, M. Iqbal; ATTA-UR-RAHMAN. Chemical constituents of *Stereospermum acuminatissimum* and their urease and α -chymotrypsin inhibitions. **Fitoterapia**, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.10.014>.

RATTANAWUT, Jessada; TODSADEE, Areerat; YAMAUCHI, Koh En. Effects of bamboo charcoal powder including vinegar supplementation on performance, eggshell quality, alterations of intestinal villi and intestinal pathogenic bacteria populations of aged laying hens. **Italian Journal of Animal Science**, vol. 16, n° 2, p. 259–265, 2017. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2017.1283544>.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 7ª Edição. Rio de Janeiro: [s. n.], 2007.

RENCORET, Jorge; RALPH, John; MARQUES, Gisela; GUTIÉRREZ, Ana; MARTÍNEZ, Ángel T.; DEL RÍO, José C. Structural characterization of lignin isolated from coconut (*Cocos nucifera*) coir fibers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 61, n° 10, p. 2434–2445, 2013. <https://doi.org/10.1021/jf304686x>.

ROGELIO, Rizalde M. Alternative Growth Enhancers for Rice Production: Usefulness of Wood Vinegar (PA) in Irrigated Rice (PSB Rc18). **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, vol. 8, n° 4, p. 82–98, 2018. .

ROSE, Michael T.; PATTI, Antonio F.; LITTLE, Karen R.; BROWN, Alicia L.; JACKSON, W. Roy; CAVAGNARO, Timothy R. A meta-analysis and review of plant-growth response to humic substances: Practical implications for agriculture. **Advances in Agronomy**. [S. l.: s. n.], 2014. p. 37–89. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800138-7.00002-4>.

ROVER, Marjorie R.; BROWN, Robert C. Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin-Ciocalteu method. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, vol. 104, p. 366–371, 2013. DOI 10.1016/j.jaap.2013.06.011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaap.2013.06.011>.

ROVER, Marjorie R.; JOHNSTON, Patrick A.; LAMSAL, Buddhi P.; BROWN, Robert C. Total water-soluble sugars quantification in bio-oil using the phenol-sulfuric acid assay. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, vol. 104, p. 194–201, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2013.08.004>.

ROZUM, J. **Liquid Smoke (Smoke Condensate) Application**. [S. l.]: Elsevier Ltd., 2014. vol. 3, . DOI 10.1016/B978-0-12-384731-7.00146-X. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384731-7.00146-X>.

RYU, Choong Min; FARAG, Mohamed A.; HU, Chia Hui; REDDY, Munagala S.; KLOEPPER, Joseph W.; PARÉ, Paul W. Bacterial volatiles induce systemic resistance in Arabidopsis. **Plant Physiology**, vol. 134, nº 3, p. 1017–1026, 2004. <https://doi.org/10.1104/pp.103.026583>.

RYU, Choong Min; FARAGT, Mohamed A.; HU, Chia Hui; REDDY, Munagala S; WEI, Han Xun; PARÉ, Paul W.; KLOEPPER, Joseph W. Bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 100, nº 8, p. 4927–4932, 2003. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730845100>.

SAID, Mahir; JOHN, Geoffrey; MHILU, Cuthbert; MANYELE, Samwel. The Study of Kinetic Properties and Analytical Pyrolysis of Coconut Shells. **Journal of Renewable Energy**, vol. 2015, p. 1–8, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/307329>.

SAKAIDA, T; ENYA, K; TANAKA, T. Effects of the wood vinegar compound on egg production and egg quality of white leghorn hens. **Japanese Poultry Science**, vol. 24, p. 44–49, 1987. .

SAMANYA, M AND YAMAUCHI, Koh-en. Morphological Dietary Changes of the Intestinal Including Villi in Chickens Wood Vinegar Fed the Charcoal Powder Compounds Mongkol Samanya and Koh-en Yamauchi * Laboratory of Animal Science , Faculty of Agriculture , Kagawa University , Japan To investiga. **Journal of Poultry Science**, nº 38, p. 289–301, 2001. .

SANTOS NASCIMENTO, Igor José dos; AQUINO, Thiago Mendonça de; SILVA-JÚNIOR, Edeildo Ferreira da. Repurposing FDA-approved Drugs Targeting SARS-CoV2 3CL pro : A Study by Applying Virtual Screening, Molecular Dynamics, MM-PBSA Calculations and Covalent Docking. **Letters in Drug Design & Discovery**, vol. 19, nº 7, p. 637–653, jul. 2022. <https://doi.org/10.2174/1570180819666220106110133>.

SCHIAVON, Michela; ERTANI, Andrea; NARDI, Serenella. Effects of an alfalfa protein hydrolysate on the gene expression and activity of enzymes of the tricarboxylic acid (TCA) cycle and nitrogen metabolism in Zea mays L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 56, nº 24, p. 11800–11808, 2008. <https://doi.org/10.1021/jf802362g>.

SHI, Wei; JU, Yanyan; BIAN, Rongjun; LI, Lianqing; JOSEPH, Stephen; MITCHELL, David R.G.; MUNROE, Paul; TAHERYMOOSAVI, Sarasadat; PAN, Genxing. Biochar bound urea boosts plant growth and reduces nitrogen leaching. **Science of the Total Environment**, vol. 701, p. 134424, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134424>.

SHIBUTANI, Sakae; YAMAUCHI, Shigeru; KIRIKOSHI, Kazuko; YATAGAI, Mitsuyoshi. Chemical Deodorant Effects of Pyroligneous Liquids from Woody Materials. **Mokuzai Gakkaishi**, vol. 60, n° 5, p. 261–268, 2014. <https://doi.org/10.2488/jwrs.60.261>.

SILVA, Raquel V.S.; PEREIRA, Vinícius B.; STELZER, Karen T.; ALMEIDA, Tamyres A.; ROMEIRO, Gilberto A.; AZEVEDO, Débora A. Comprehensive study of the liquid products from slow pyrolysis of crambe seeds: Bio-oil and organic compounds of the aqueous phase. **Biomass and Bioenergy**, vol. 123, n° February, p. 78–88, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.02.014>.

SIMMA, Bubpha; POLTHANEE, Anan; GOGGI, A. Susana; SIRI, Boonmee; PROMKHAMBUT, Arunee; CARAGEA, Petrutza C. Wood vinegar seed priming improves yield and suppresses weeds in dryland direct-seeding rice under rainfed production. **Agronomy for Sustainable Development**, vol. 37, n° 6, 2017. <https://doi.org/10.1007/s13593-017-0466-2>.

SIVARAM, Anithadevi Kenday; PANNEERSELVAN, Logeshwaran; MUKUNTHAN, Kannappar; MEGHARAJ, Mallavarapu. Effect of Pyroligneous Acid on the Microbial Community Composition and Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) in Soils. **Soil Systems**, vol. 6, n° 1, 1 mar. 2022. <https://doi.org/10.3390/soilsystems6010010>.

SOURI, Mohammad Kazem; HATAMIAN, Mansoure. Aminochelates in plant nutrition: a review. **Journal of Plant Nutrition**, vol. 42, n° 1, p. 67–78, 2019. DOI 10.1080/01904167.2018.1549671. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/01904167.2018.1549671>.

SOUZA, Juliana Leitzke Santos de; GUIMARÃES, Victoria Burmann da Silva; CAMPOS, Angela Diniz; LUND, Rafael Guerra. Antimicrobial potential of pyroligneous extracts – a systematic review and technological prospecting. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 49, p. 128–139, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.07.001>.

STANKOVÍKJ, Filip; MCDONALD, Armando G.; HELMS, Gregory L.; OLARTE, Mariefel v.; GARCIA-PEREZ, Manuel. Characterization of the Water-Soluble Fraction of Woody Biomass Pyrolysis Oils. **Energy and Fuels**, vol. 31, n° 2, p. 1650–1664, 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.6b02950>.

STAŠ, Martin; KUBIČKA, David; CHUDOBA, Josef; POSPÍŠIL, Milan. Overview of analytical methods used for chemical characterization of pyrolysis bio-oil. **Energy and Fuels**, vol. 28, n° 1, p. 385–402, 2014. <https://doi.org/10.1021/ef402047y>.

STEINER, Christoph; DAS, Keshav C.; GARCIA, Marcos; FÖRSTER, Bernhard; ZECH, Wolfgang. Charcoal and smoke extract stimulate the soil microbial community in a highly weathered xanthic Ferralsol. **Pedobiologia**, vol. 51, n° 5–6, p. 359–366, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2007.08.002>.

SUN, Haijun; FENG, Yanfang; XUE, Lihong; MANDAL, Sanchita; WANG, Hailong; SHI, Weiming; YANG, Linzhang. Responses of ammonia volatilization from rice paddy soil to application of wood vinegar alone or combined with biochar. **Chemosphere**, vol. 242, p. 125247, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125247>.

SURESH, Gayatri; PAKDEL, Hooshang; ROUISSI, Tarek; BRAR, Satinder Kaur; FLISS, Ismail; ROY, Christian. In vitro evaluation of antimicrobial efficacy of pyroligneous acid from softwood mixture. **Biotechnology Research and Innovation**, vol. 3, n° 1, p. 47–53, 2019. DOI 10.1016/j.biori.2019.02.004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biori.2019.02.004>.

SVANE, Simon; SIGURDARSON, Jens Jakob; FINKENWIRTH, Friedrich; EITINGER, Thomas; KARRING, Henrik. Inhibition of urease activity by different compounds provides insight into the modulation and association of bacterial nickel import and ureolysis. **Scientific Reports**, vol. 10, n° 1, p. 1–14, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65107-9>.

TANAKA, Toru; KAWASE, Masami; TANI, Satoru. Urease inhibitory activity of simple α,β -unsaturated ketones. **Life Sciences**, vol. 73, n° 23, p. 2985–2990, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(03\)00708-2](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(03)00708-2).

TANAKA, Toru; KAWASE, Masami; TANI, Satoru. α -Hydroxyketones as inhibitors of urease. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, vol. 12, n° 2, p. 501–505, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2003.10.017>.

TEIXEIRA, Walquíria F.; FAGAN, Evandro B.; SOARES, Luis H.; SOARES, Jérssica N.; REICHARDT, Klaus; NETO, Durval D. Seed and foliar application of amino acids improve variables of nitrogen metabolism and productivity in soybean crop. **Frontiers in Plant Science**, vol. 9, n° 3, p. 1–12, 2018. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00396>.

THEAPPARAT, Y.; CHANDUMPAL, A.; LEELASUPHAKUL, W.; LAEMSAK, N. Pyroligneous acids from carbonisation of wood and bamboo: Their components and antifungal activity. **Journal of Tropical Forest Science**, vol. 27, n° 4, p. 517–526, 2015a. .

THEAPPARAT, Y.; CHANDUMPAL, A.; LEELASUPHAKUL, W.; LAEMSAK, N. Pyroligneous acids from carbonisation of wood and bamboo: Their components and antifungal activity. **Journal of Tropical Forest Science**, vol. 27, n° 4, p. 517–526, 2015b. .

THEAPPARAT, Yongyuth; CHANDUMPAL, AUSA; FAROONGSARNG, Damrongsak. Chapter 8: Physicochemistry and Utilization of Wood Vinegar from Carbonization of Tropical Biomass Waste. **Tropical Forests - New Edition**. [S. l.]: IntechOpen, 2018. p. 163-. <https://doi.org/10.5772/intechopen.77380> Abstract.

THEAPPARAT, Yongyuth; CHANDUMPAL, AUSA; LEELASUPHAKUL, Wichitra; LAEMSAK, Nikhom; PONGLIMANONT, Chanita. Physicochemical characteristics of wood vinegars from carbonization of *leucaena leucocephala*, *azadirachta indica*, *eucalyptus camaldulensis*, *hevea brasiliensis* and *dendrocalamus asper*. **Kasetsart Journal - Natural Science**, vol. 48, n° 6, p. 916–928, 2014. .

TSUZUKI, E; MORIMITSU, T; MATSUI, T. Effect of chemical compounds in pyroligneous acid on root growth in rice plant. **Report of the Kyushu Branch of the Crop Science Society of Japan**, 2000. .

UDDIN, S M Moslem; MURAYAMA, Seilchi; ISHIMINE, Yukio; TSUZUKI, Eiji. Studies on Sugarcane Cultivation - 1 . Effects of the mixture of charcoal with pyroligneous acid on

cane and sugar yield of spring and ratoon crops of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Jpn. J. Trop. Agr.**, vol. 38, n° 4, p. 281–285, 1994. .

UNITED NATIONS. Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development. 2015. **General Assembly Resolution A/RES/70/1**. Disponível em: <https://sdgs.un.org/2030agenda>. Acessado em: 7 ago. 2022.

UTHAYAKUMAR, R.; PRABAKAR, G. Arockia; AZIS, S. Abdul. Fractal analysis of soil pore variability with two dimensional binary images. **Fractals**, vol. 19, n° 4, p. 401–406, 2011. <https://doi.org/10.1142/S0218348X11005567>.

UTSUMI, Yoshinori; UTSUMI, Chikako; TANAKA, Maho; HA, Chien van; TAKAHASHI, Satoshi; MATSUI, Akihiro; MATSUNAGA, Tomoko M.; MATSUNAGA, Sachihito; KANNO, Yuri; SEO, Mitsunori; OKAMOTO, Yoshie; MORIYA, Erika; SEKI, Motoaki. Acetic acid treatment enhances drought avoidance in cassava (*Manihot esculenta* crantz). **Frontiers in Plant Science**, vol. 10, n° April, p. 1–12, 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00521>.

VAN STADEN, J.; JÄGER, A. K.; LIGHT, M. E.; BURGER, B. V. Isolation of the major germination cue from plant-derived smoke. **South African Journal of Botany**, vol. 70, n° 4, p. 654–659, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(15\)30206-4](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(15)30206-4).

VAUGHAN, D.; ORD, B. G. Influence of natural and synthetic humic substances on the activity of urease. **Journal of Soil Science**, vol. 42, p. 17–23, 1991. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.1991.tb00087.x>.

VENDITTI, T.; D’HALLEWIN, G.; DORE, A.; MOLINU, M. G.; FIORI, P.; ANGIOLINO, C.; AGABBIO, M. Acetic acid treatments to keep postharvest quality of “Regina” and “Taloppo” table grapes. **Communications in agricultural and applied biological sciences**, vol. 73, n° 2, p. 265–71, 2008. .

VERDONK, Marcel L.; COLE, Jason C.; HARTSHORN, Michael J.; MURRAY, Christopher W.; TAYLOR, Richard D. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, vol. 52, n° 4, p. 609–623, 1 ago. 2003. <https://doi.org/10.1002/prot.10465>.

WANG, H. F.; WANG, J. L.; WANG, C.; ZHANG, W. M.; LIU, J. X.; DAI, B. Effect of bamboo vinegar as an antibiotic alternative on growth performance and fecal bacterial communities of weaned piglets. **Livestock Science**, vol. 144, n° 1–2, p. 173–180, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2011.11.015>.

WANG, Ming; SCHOETTNER, Matthias; XU, Shuqing; PAETZ, Christian; WILDE, Julia; BALDWIN, Ian T.; GROTEN, Karin. Catechol, a major component of smoke, influences primary root growth and root hair elongation through reactive oxygen species-mediated redox signaling. **New Phytologist**, vol. 213, n° 4, p. 1755–1770, 2017. <https://doi.org/10.1111/nph.14317>.

WANG, Qing; HE, Jiawei; WU, Di; WANG, Jing; YAN, Jin; LI, Hui. Interaction of α -cyperone with human serum albumin: Determination of the binding site by using Discovery

Studio and via spectroscopic methods. **Journal of Luminescence**, vol. 164, p. 81–85, ago. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2015.03.025>.

WANG, Quan; AWASTHI, Mukesh Kumar; REN, Xiuna; ZHAO, Junchao; LI, Ronghua; WANG, Zhen; WANG, Meijing; CHEN, Hongyu; ZHANG, Zengqiang. Combining biochar, zeolite and wood vinegar for composting of pig manure: The effect on greenhouse gas emission and nitrogen conservation. **Waste Management**, vol. 74, p. 221–230, 2018. DOI 10.1016/j.wasman.2018.01.015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.01.015>.

WANG, Shurong; GUO, Xiujuan; WANG, Kaige; LUO, Zhongyang. Influence of the interaction of components on the pyrolysis behavior of biomass. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, vol. 91, nº 1, p. 183–189, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2011.02.006>.

WANG, Yuying; QIU, Ling; SONG, Qilu; WANG, Shuping; WANG, Yajun; GE, Yihong. Root proteomics reveals the effects of wood vinegar on wheat growth and subsequent tolerance to drought stress. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 20, nº 4, p. 1–23, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20040943>.

WANG, Zhouhong. **Understanding Cellulose Primary and Secondary Pyrolysis Reactions to Enhance The Production of Anhydrosaccharides and to Better Predict The Composition of Carbonaceous Residues**. 2013. Washington State University, 2013.

WASSERMAN, Aaron E. Organoleptic Evaluation of Three Phenols Present in Wood Smoke. **Journal of Food Science**, vol. 31, nº 6, 1966. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1966.tb03284.x>.

WATARAI, S; TANA, S. Eliminating the Carriage of Salmonella enterica Serovar Enteritidis in Domestic Fowls by Feeding Activated Charcoal from Bark Containing Wood Vinegar Liquid. **Poultry Science**, vol. 84, nº 4, p. 515–521, 2005. .

WEATHERBURN, M W. **Phenol-Hypochlorite Reaction for Determination of Ammonia**. [S. l.: s. n.], 1954. DOI 10.1021/ac60252a045. Disponível em: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.

WEI, Qin; MA, Xihan; DONG, Juane. Preparation, chemical constituents and antimicrobial activity of pyroligneous acids from walnut tree branches. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, vol. 87, nº 1, p. 24–28, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2009.09.006>.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials j. **Journal of Automatic Chemistry of Clinical Laboratory Automation**, vol. 8, nº 4, p. 170–177, 1986. .

WIN, Khin Thawda; TOYOTA, Koki; MOTOBAYASHI, Takashi; HOSOMI, Masaaki. Suppression of ammonia volatilization from a paddy soil fertilized with anaerobically digested cattle slurry by wood vinegar application and floodwater management. **Soil Science and Plant Nutrition**, vol. 55, nº 1, p. 190–202, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2008.00337.x>.

XIN, Quan; JIANRONG, Shan; YU, Xing; CHI, Peng; HONGYAN, Wang; CHOL, Ju Yong; WEI, Zhao; JINXIA, Fan. New horizons in the application of a neglected biomass pyrolysis byproduct: A marked simultaneous decrease in ammonia and carbon dioxide emissions.

Journal of Cleaner Production, n° Journal Pre-proof, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126626>.

YAMAUCHI, K.; MATSUMOTO, Y.; YAMAUCHI, K. Egg collagen content is increased by a diet supplemented with wood charcoal powder containing wood vinegar liquid. **British Poultry Science**, vol. 57, n° 5, p. 601–611, 2016.

<https://doi.org/10.1080/00071668.2016.1206193>.

YAMAUCHI, K.; RUTTANAVUT, J.; TAKENOYAMA, S. Effects of dietary bamboo charcoal powder including vinegar liquid on chicken performance and histological alterations of intestine. **Journal of Animal and Feed Sciences**, vol. 19, n° 2, p. 257–268, 2010.

<https://doi.org/10.22358/jafs/66286/2010>.

YANG, Fan; ZHANG, Shuaishuai; SONG, Jingpeng; DU, Qing; LI, Guixiang; TARAKINA, Nadezda V.; ANTONIETTI, Markus. Synthetic Humic Acids Solubilize Otherwise Insoluble Phosphates to Improve Soil Fertility. **Angewandte Chemie - International Edition**, vol. 58, n° 52, p. 18813–18816, 2019. <https://doi.org/10.1002/anie.201911060>.

YATAGAI, Mitsuyoshi. 木竹酢液ハンドブック **Handbook of Mokusaku- and Chikusaku- liquors**. [S. l.: s. n.], 2013.

YATAGAI, Mitsuyoshi; NISHIMOTO, Madoka; HORI, Keko; OHIRA, Tatsuro; SHIBATA, Akira. Termiticidal activity of wood vinegar, its components and their homologues. **Journal of Wood Science**, vol. 48, n° 4, p. 338–342, 2002. <https://doi.org/10.1007/BF00831357>.

YUN, Ji Eun; LEE, Dong Gun. A novel fungal killing mechanism of propionic acid. **FEMS Yeast Research**, vol. 16, n° 7, p. 1–8, 2016. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow089>.

ZABKA, Martin; PAVELA, Roman. Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. **Chemosphere**, vol. 93, n° 6, p. 1051–1056, 2013. DOI 10.1016/j.chemosphere.2013.05.076. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.076>.

ZANDONADI, Daniel B.; SANTOS, Mirella P.; DOBBSS, Leonardo B.; OLIVARES, Fábio L.; CANELLAS, Luciano P.; BINZEL, Marla L.; OKOROKOVA-FAÇANHA, Anna L.; FAÇANHA, Arnaldo R. Nitric oxide mediates humic acids-induced root development and plasma membrane H⁺-ATPase activation. **Planta**, vol. 231, n° 5, p. 1025–1036, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1106-0>.

ZHANG, Rui; WEI, Dai; YAO, Zhibin; CHAO, Zhao; XIAOJUAN, An. Effects of wood vinegar on the soil microbial characteristics. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, vol. 6, n° 3, p. 1254–1260, 2014. .

ZHANG, WEI; AI, QIJUN; WU, Xiaohu. Antifungal effects in-vitro of pyrolin on two rot-causing fungi and observation under scanning electron microscope. **Shipin Keji**, vol. 1, p. 182–185, 2008. .

ZHANG, Yuchan; WANG, Xiao; LIU, Bingjie; LIU, Qiang; ZHENG, Hao; YOU, Xiangwei; SUN, Ke; LUO, Xianxiang; LI, Fengmin. Comparative study of individual and Co-Application of biochar and wood vinegar on blueberry fruit yield and nutritional quality. **Chemosphere**, vol. 246, p. 125699, 2020. DOI 10.1016/j.chemosphere.2019.125699. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125699>.

ZHAO, Xiaoyan; ZHOU, Likai. Effect of the urease inhibitor, hydroquinone on soil enzyme activities. **Soil Biology and Biochemistry**, vol. 23, nº 11, p. 1089–1091, 1991. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(91\)90049-P](https://doi.org/10.1016/0038-0717(91)90049-P).

ZULKARAMI, B.; ASHRAFUZZAMAN, M.; HUSNI, M.O.; ISMAIL, Mohd. Razi. Effect of pyroligneous acid on growth, yield and quality improvement of rockmelon in soilless culture. **Australian Journal of Crop Science**, vol. 5, nº 12, p. 1508–1514, 2011. .

16	10,452	1-(Furan-2-il)-etanona; 2-acetilfurano							95	0,57%	17834702			
17	10,503	Álcool tetrahidrofurfurílico				92	1,58%	8092605	93	1,78%	55577720	94	3,18%	13347105
18	10,881	3-metil-2-ciclopenten-1-ona	89	1,33%	39552875	98	0,54%	2747443				97	0,50%	2105972
19	11,055	3,3-Dimetil-2-butanona				93	0,54%	2751025				92	0,48%	2033241
20	11,099	Ácido propanóico	88	2,28%	67587229	95	2,72%	13940734	87	2,25%	69978343	93	1,99%	8357134
21	11,19	2,3-Pentanodiona							93	0,73%	22780868			
22	11,417	2,3-dimetil-2-ciclopenten-1-ona,	96	0,50%	14674899	95	0,47%	2398925	95	0,35%	10756812	94	0,42%	1751973
23	11,913	Ácido isobutírico; ácido 2-metilpropiônico							86	0,09%	2803147			
24	11,953	Éster metílico do ácido levulínico; levulinato de metila	95	0,24%	7211333	96	0,50%	2575272	98	0,32%	10013626	96	0,49%	2074414
25	12,079	5-metilfurfural	96	0,60%	17847515	95	0,93%	4740939	90	0,50%	15486759	89	0,51%	2142902
26	12,192	3,6-heptanodiona	90	0,11%	3226065				88	0,19%	5833291			
27	12,804	Di-hidro-5-metil-2(3H)-furanona; gamma-valerolactona	90	0,08%	2253154				92	0,14%	4438907			
28	13,08	Éster fenílico do ácido acético							95	0,09%	2665469			
29	13,144	Butirolactona	98	1,12%	33126655	92	0,40%	2060720	96	0,82%	25587646	96	0,76%	3192864
30	13,288	Ácido butanóico; ácido butírico	96	0,80%	23649890	96	0,91%	4674221	92	0,80%	24831471	96	0,71%	2962918
31	13,45	3-Etilciclopent-2-en-1-ona	91	0,16%	4674473	90	0,11%	562667	90	0,13%	4185984			
32	13,544	Éster 2-hidroxietílico do ácido acético	97	0,35%	10243083				96	0,05%	1432000			
33	13,732	2,5-Dihidro-3,5-dimetil-2-furanona	95	0,57%	16938487	95	0,51%	2608738	93	0,33%	10185963	93	0,38%	1603277
34	14,051	Álcool furfurílico	94	0,33%	9657342	95	0,39%	2003836	96	0,68%	21283654	96	0,54%	2275575

35	14,294	Ácido 3-metil-butanóico, ácido isovalérico							95	0,13%	4061739			
36	14,35	5-Metil-2(5H)-furanona	94	0,35%	10352335							85	0,15%	631861
37	14,388	Desconhecido								0,09%	2724512			
38	14,735	Desconhecido								0,11%	3356504			
39	14,74	Desconhecido								0,05%	1637872		0,07%	288265
40	15,003	Desconhecido								0,08%	2490008		0,11%	459683
41	15,265	3-metil-2(5H)-Furanona	94	0,54%	15915373									
42	15,277	2-Metil-2-pentenal				90	0,25%	1275482	89	0,13%	4117297	88	0,21%	866213
43	15,507	4,5-Dimetil-4-hexen-3-ona	89	0,08%	2408946	92	0,20%	1002936	90	0,24%	7417910	87	0,11%	464299
44	15,838	Ácido valérico; ácido pentanóico	96	0,10%	3107790	90	0,12%	610182	97	0,12%	3888672	90	0,09%	397429
45	16,014	2(5H)-Furanona	93	0,74%	22031646	90	0,10%	532403	86	0,11%	3314359			
46	16,226	5-Etil-2(5H)-furanona	83	0,07%	2113645									
47	16,45	2-hidroxi-2-ciclopenten-1-ona	89	0,55%	16240464									
48	16,461	Desconhecido								0,06%	1826369			
49	16,471	2-metil-ciclopentanona										81	0,07%	294094
50	16,597	Ácido 2-butenóico; ácido crotônico	96	0,51%	15192944	89	0,19%	972774	76	0,29%	9168394	84	0,18%	766295
51	17,083	3,5-Dimetil ciclopentenolona	92	0,48%	14276105	91	0,23%	1173405	86	0,22%	6924970	91	0,28%	1157315
52	17,306	5-valerolactona							90	0,18%	5700996			
53	17,447	Ácido 4-pentenóico	91	0,08%	2439501									
54	17,793	2-hidroxi-3-metil-2-ciclopenten-1-ona	96	9,19%	272427497	96	2,56%	13103807	95	1,39%	43443905	96	3,41%	14318597

55	18,066	3,4-Dimetil ciclopentenolona	91	0,12%	3537512				90	0,06%	1747617			
56	18,349	Guaiacol; 2-metoxi-fenol	93	1,84%	54390871	98	2,64%	13483524	98	6,43%	200400405	98	2,13%	8948289
57	18,516	Ácido 2-pentenóico	91	0,14%	4065438									
58	18,659	2-metoxi-3-metilfenol;				78	0,08%	432522	92	0,09%	2786152			
59	18,829	Desconhecido		0,13%	3958568									
60	19,036	4-metil-5H-furan-2-ona	96	0,27%	7857955				83	0,06%	1829079			
61	19,218	3-etil-2-hidroxi-2-ciclopenten-1-ona	97	1,41%	41924423	97	0,60%	3083623	87	0,67%	21017069	96	0,75%	3135388
62	19,448	2,6-Dimetil-fenol; 2,6-xilenol	84	0,11%	3176191				94	0,05%	1709197			
63	19,574	Desconhecido								0,10%	3049049			
64	20,135	2-Metoxi-5-metilfenol; 5-metilguaiacol				88	0,11%	548055	96	0,12%	3868688	84	0,19%	787654
65	20,414	2-Metoxi-4-metilfenol; 4-metilguaiacol	96	1,21%	35885318	97	2,02%	10337880	97	1,45%	45293523	96	1,40%	5894502
66	20,71	Desconhecido					0,14%	738245						
67	20,791	3-Hidroxi-2-metil-4H-Piran-4-ona; maltol	97	1,98%	58625567				95	0,33%	10352115	93	0,42%	1743634
68	20,876	2-hidroxi-3-propil-2-ciclopenten-1-ona				85	0,36%	1865667				83	0,47%	1954098
69	21,323	Fenol	94	5,86%	173714218	91	2,31%	11816726	86	33,98%	1058455648	92	2,48%	10397674
70	21,697	Desconhecido		0,15%	4582062		0,21%	1091134		0,17%	5183372			
71	21,927	4-Etil-2-metoxi-fenol; etil-guaiacol	91	0,43%	12823623	93	0,98%	5009454	92	0,77%	23846557	92	0,57%	2383032
72	22,486	1,2,3-trimetoxi-5-metil-benzeno				92	0,14%	714184				85	0,09%	392052
73	22,75	Desconhecido								0,50%	15474220			

74	22,912	4-Metilfenol, <i>p</i> -cresol	97	1,53%	45260311	95	0,68%	3482972	97	1,43%	44578344	93	0,62%	2589000
75	23,05	3-Metilfenol; <i>m</i> -cresol	89	3,19%	94682666	96	0,97%	4960602	97	1,02%	31914862	95	0,86%	3615229
76	23,207	3,4-Dimetoxifenol;				81	0,15%	746202	88	0,11%	3543954	85	0,18%	765192
77	23,322	Éster metílico do ácido 4-metoxibenzóico;							95	0,13%	3925487			
78	23,5	2-metoxi-4-propil-fenol				90	0,15%	770191	89	0,06%	1796158	84	0,09%	370348
79	24,238	2,5-dimetilfenol; 2,5-xilenol	89	0,12%	3679623				92	0,04%	1240091	83	0,11%	469423
80	24,608	2-metoxi-4-(1-propenil)-fenol; Isoeugenol				77	0,07%	344725	79	0,05%	1685626			
81	24,741	3,4-dimetilfenol	94	0,25%	7500340	92	0,27%	1372573				90	0,30%	1241088
82	24,744	4-etilfenol							96	0,27%	8379247			
83	24,876	3-etilfenol; <i>m</i> -etilfenol	87	0,05%	1580080	72	0,21%	1080982	70	0,06%	1986268			
84	24,912	Butirato de alila	94	2,44%	72246464				95	2,72%	84659993			
85	25,287	1,6-heptadieno-4-ol				83	0,37%	1890680				82	0,74%	3122764
86	25,604	3,4-dimetilfenol ; 3,4-xilenol	94	0,14%	4208696	90	0,13%	641517	81	0,11%	3567732	85	0,20%	860489
87	25,996	Monoacetato de glicerol							92	0,06%	1718401			
88	26,115	Palmitato de metila	93	0,05%	1563040	93	0,29%	1480574	97	0,18%	5656360	88	0,19%	807565
89	26,532	2,6-dimetoxifenol; siringol	95	10,28%	304560771	96	12,89%	65955149	96	6,61%	205872333	96	20,31%	85266420
90	27,72	Ácido levulínico	98	1,21%	35843877	84	0,18%	941971	86	0,30%	9201340	84	0,36%	1516429
91	28,129	Metilsiringol	84	4,62%	137053062	83	7,64%	39108782	83	1,30%	40466900	83	9,70%	40729618
92	28,291	Desconhecido								0,12%	3633603			
93	28,776	1,4:3,6-Dianidro-alfa-d-glicopirranose	90	0,51%	15128861				74	0,23%	7239855			
94	29,102	4-etil-2,6-dimetoxifenol		1,93%	57323918		4,95%	25343564		0,63%	19587873		4,42%	18575870
95	29,399	Desconhecido								0,11%	3468783			
96	29,781	Ácido benzóico				87	0,12%	592002	92	0,20%	6180496	93	0,46%	1914772
97	29,887	Estearato de metila	94	0,04%	1113070	95	0,49%	2518175	95	0,25%	7808073	91	0,50%	2118537
98	30,153	Oleato de metila	94	0,10%	2917512	96	0,75%	3850995	97	0,40%	12338455	94	0,56%	2331614

99	30,657	5-Hidroximetilfurfural				83	0,14%	729676				83	0,30%	1260858
100	30,909	Linoleato de metila	93	0,10%	2843839	95	0,49%	2510176	95	0,20%	6245581	93	0,46%	1913297
101	31,346	4-Alil-2,6-dimetoxifenol	91	0,14%	4213467	90	0,26%	1321537	83	0,09%	2838406	84	0,24%	991705
102	31,637	Vanilina; 4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído				91	0,25%	1277670	96	0,15%	4577127	89	0,41%	1731032
103	32,156	Ácido heptanoico							82	0,35%	10979151	80	0,41%	1740978
104	32,315	Vanilato de metila				72	0,20%	1015955	86	0,21%	6540811	73	0,41%	1710546
105	32,881	1- (4-hidroxi-3-metoxifenil)-etanona; acetovanilona	96	0,24%	7151997	90	0,23%	1159683	96	0,20%	6105448	92	0,33%	1384383
106	33,142	1- (4-hidroxi-3-metoxifenil) -2-propanona	90	0,64%	18983868	88	0,55%	2835684	91	0,89%	27671754	90	0,91%	3826987
107	34,142	3-metilpirocatecol; 3-metil- 1,2-benzenodiol	84	5,30%	157162349									
108	34,477	4-Alil-2,6-dimetoxifenol ; 2,6-dimetoxi-4-(2-propenil)-fenol	80	3,26%	96650612							80	0,20%	819165
109	36,926	1-(3-hidroxiifenil)-etanona	90	0,15%	4316489									
110	37,228	Ácido 3-hidroxi-4-metilbenzóico							80	0,26%	8060610			
111	38,333	ácido n-hexadecanóico; Ácido palmítico				91	0,45%	2301313				80	0,16%	687541
112	38,466	Metilparabeno; Éster metílico do ácido 4-hidroxibenzóico;							97	0,50%	15451691			
113	38,685	4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzaldeído; siringaldeído	88	0,12%	3554435	91	0,41%	2106754	90	0,12%	3729141	83	0,30%	1250899
114	39,989	2-metil-1,4-benzenodiol; metil-hidroquinona	81	1,63%	48339085				87	0,45%	13959336			
115	40,012	1-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-etanona				92	0,80%	4114696				80	0,85%	3562385

116	40,584	Desconhecido				1,32%	6761653			1,22%	5121327
117	40,642	Hidroquinona; 1,4-benzenediol	75	3,35%	99260262			79	1,33%	41286066	
118	41,703	Desconhecido							0,11%	3400483	
119	43,275	Desconhecido							0,03%	1083750	
120	44,884	Desconhecido				0,26%	1353618		0,06%	1943310	
121	45,917	Desconhecido				83	0,37%	1899370	86	0,07%	2245702

[illegible]

26,82	Ácido 4-oxo-pentanoico			18462240	97	63144863	98	104775692	98	23938882	97			1,46%	210321677
29,246	(S)-(+)-2',3'-Dideoxirribonolactona			2789566	87	28557961	97	77348947	97			75383210	96	1,28%	184079684
38,677	Hidroquinona	8547649	73					84505213	97	82843272	97			1,22%	175896134
25,355	2,3-Anidro-D-manosano			10781551	94	64480682	95	72771916	95	1812688	88	20776087	92	1,19%	170622924
19,908	Maltol			96175029	98	44041522	98	3100571	96					1,00%	143317122
3,008	2-Metil-1-propanol (ou isobutilo)	20527621	93	16831587	95			72953438	96			29916517	97	0,98%	140229163
33,886	4-Metil-1,2-benzenodiol			71709127	96	29125150	94	30137320	94					0,91%	130971597
21,674	2,2-Dimetil-3-heptanona					32103310	84	53822142	84	7497284	84	18275148	84	0,78%	111697884
39,966	1,4-Diacetil-3-acetoximetil-2,5-metileno-l-ramnitol					4664209	82	19316483	84	4183072	84	78094874	85	0,74%	106258638
12,422	Ácido 4-hidroxi-butanoico			104853639	98			1124351	92					0,74%	105977990
38,816	Desaspidinol			105770927	83									0,74%	105770927
38,036	2-Metil-1,4-benzenodiol			7980981	90	7894051	95	68654084	96	14797299	96			0,69%	99326415
22,115	3-Metil-fenol	11814310	87	77947650	96									0,62%	89761960
22,022	Desconhecido					20352743	88	31522034	87	37835639	88			0,62%	89710416
18,545	Etilciclopentenolona	6813249	95	80755817	96									0,61%	87569066
45,323	3-Pentadecil-fenol							86852453	95					0,60%	86852453
15,142	2(5H)-Furanona			41315694	96	41630146	94	1851758	93			1655619	87	0,60%	86453217
10,369	Ácido propanoico			19362166	85	44394349	97	14524608	98	649254	90	857022	80	0,56%	79787399
5,51	Hidrazida do ácido acético							78824506	94					0,55%	78824506
12,419	Butirolactona					56490293	98			5159820	94	8216279	90	0,49%	69866392
12,813	Monoacetato de 1,2-etanodiol			4202983	92	43480596	96	21189720	98					0,48%	68873299
38,321	1-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-etanona	2726765	89	62072822	97	1725157	88							0,46%	66524744
43,9	Desconhecido					3502412	81	20449753	84			42201837	84	0,46%	66154002
32,016	Desconhecido							12106312	82			49840499	83	0,43%	61946811
23,669	2-Hidroxi-gama-butirolactona	1928744				4036500	92	15914440	95	3613589	93	35547916	95	0,42%	61041189

29,825	Pentadecil-benzeno	27046496	91																0,19%	27046496
15,704	Ácido (E)-2-butenóico (ou ácido (E)-crotonóico)			15621350	97	5543938	90				5314562	96	0,18%	26479850						
16,249	3,5-Dimetil ciclopentenolona	1432598	85	24531003	94								0,18%	25963601						
33,167	α-Metil 4-O-metil-D-manosídeo									24778120	82	0,17%	24778120							
35,627	1-(3-hidroxifenil)-etanona			22485944	88	1582355	81						0,17%	24068299						
25,06	Desconhecido									24008635	84	0,17%	24008635							
12,929	2,5-Dihidro-3,5-dimetil-2-furanona			23939114	97								0,17%	23939114						
29,62	5-(Hidroximetil)-2-furancarboxaldeído							22648601	91				0,16%	22648601						
37,173	4-hidroxi-3,5-dimetóxi-benzaldeído			20271310	93	945815	78						0,15%	21217125						
9,864	Ácido fórmico							8817722	97	8929743	99	3298937	94	0,15%	21046402					
36,871	Ácido n-hexadecanoico (ou ácido palmítico)	17765206	94			1590644	76	910185	83				0,14%	20266035						
20,204	4-Metil-fenol	20010850	84										0,14%	20010850						
17,449	2-Metóxi-fenol	1320803	91	18663587	90								0,14%	19984390						
14,352	Desconhecido							2862388	80			16997210	79	0,14%	19859598					
26,624	Éster isopropílico do ácido butanoico					19515435	88						0,14%	19515435						
29,235	Desconhecido									18956399	81		0,13%	18956399						
13,517	5-metil-2(3H)-Furanona			18527777	97								0,13%	18527777						
33,225	Ácido tetradecanoico (ou ácido mirístico)	18384449	94										0,13%	18384449						
28,596	Ácido 4-acetilbutírico					12528187	93	5728906	94				0,13%	18257093						
35,684	Desconhecido	17650066	94										0,12%	17650066						
17,217	3,4-Dimetil ciclopentenolona			16047582	89								0,11%	16047582						
26,837	2-Pentanona							5139195	93	10157776	93	0,11%	15296971							

22,266	2-Etil-fenol	15205416	94							0,11%	15205416
19,079	Éster etílico do ácido 2-(hidroximetil)-butanoico					9986222	81	5214161	81	0,11%	15200383
12,839	2,5-diethoxytetrahydrofuran							15136835	80	0,11%	15136835
17,157	3-metil-1,2-ciclopentanodiona	14994701	88							0,10%	14994701
23,327	1,4:3,6-Dianidro-alfa-D-glicopiranoose					8925738	95	5601486	88	0,10%	14527224
10,057	Benzaldeído			14340293	95					0,10%	14340293
7,601	Anidrido maleico (ou ácido butenodioico)							1649846	86	0,10%	14180571
37,911	Hidrazida do ácido 4-hidroxi-3,5-dimetóxi-benzóico	3345542	86	10317797	84					0,10%	13663339
18,183	Desconhecido							13439190	85	0,09%	13439190
30,637	4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído			13426152	95					0,09%	13426152
21,398	Desconhecido			12921246	86					0,09%	12921246
16,127	Acetamida					1125917	83	2818777	94	0,09%	12901275

APÊNDICE B - Produção científica oriunda desta tese

Artigos publicados até o presente momento (02/10/2023)

Science of the Total Environment 881 (2023) 163519



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv



Review

Understanding the multifunctionality of pyroligneous acid from waste biomass and the potential applications in agriculture



Núbia Rangel Cândido ^{a,*}, Vânia Márcia Duarte Pasa ^a, Adriana de Oliveira Vilela ^b, Ângela Diniz Campos ^c, Ângelo de Fátima ^{a,*}, Luzia Valentina Modolo ^{d,*}

^a Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b EPB Extrato Pirolenhoso do Brasil Indústria e Comércio LTDA, Belo Horizonte, MG, Brazil

^c Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Empresa Clima Temperado (CPACT), Laboratório de Fisiologia Vegetal, Monte Bonito, RS, Brazil

^d Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

HIGHLIGHTS

- Liquid smoke, a byproduct of organic matter pyrolysis, emerged as a promising fertilizer additive.
- Pyroligneous acid boosts plant growth and development and mitigates greenhouse gases.
- The use of wood vinegar comprises an approach for a more sustainable agriculture.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Editor: Charlotte Poschenrieder

Keywords

Plant biomass pyrolysis
Pyroligneous liquid
Pyroligneous acid toxicity
Food production

ABSTRACT

Efforts have been directed to the development of environmentally friendly processes and manufacturing of green products, use of renewable energy and more sustainable agricultural practices. Pyroligneous acid (PA) is a byproduct of biomass pyrolysis that consists of a complex mixture of bioactive substances. The complexity and richness of PA composition have opened a window for PA application in agriculture and mitigation of environmental pollution. This review brings a brief historical on the use of PA and regulatory policies adopted in Brazil, China, Japan and Thailand for PA application in agriculture. The composition and stability of PAs of several origins are presented, together with a discussion of the use of PA to boost plant growth and crop productivity, remove toxic metals from soil, inhibit soil ureases, mitigate the emission of greenhouse gases, control phytopathogen proliferation and weed dissemination. A great variety of biomass types are reported as feedstock to produce PA with distinct chemically diverse and active substances at wide-ranging concentrations. PA has been shown to successfully improve farming practices in a more sustainable fashion. The disclosure of the mechanisms of action that drive the PA's effects, together with the pursue of safety and efficacy data in a case-by-case way to address toxicity and shelf stability, will be valuable to expand the use of PA worldwide for food production.

* Corresponding authors.

E-mail addresses: adelatima@qui.ufmg.br (Â. de Fátima), lvmodolo@ich.ufmg.br (L.V. Modolo).

<https://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163519>

Received 22 August 2022; Received in revised form 24 March 2023; Accepted 11 April 2023

Available online 13 April 2023

0048-9697/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

EXTRATOS PIROLENHOSOS DE CASCA DE COCO, ACÁCIA NEGRA E EUCALIPTO: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO *IN VITRO* COMO POTENCIAIS INIBIDORES DA UREASE

Núbia Rangel Cândido^a, Luzia Valentina Modolo^b, Vânia Márcia Duarte Pasa^a e Ângelo de Fátima^{a,*}

^aDepartamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte – MG, Brasil

^bDepartamento de Botânica, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte – MG, Brasil

Recebido em 24/01/2023; aceito em 18/05/2023; publicado na web 12/07/2023

PYROLIGNEOUS ACIDS OF COCONUT SHELL, BLACK WATTLE AND EUCALYPTUS: PHYSICAL-CHEMICAL CHARACTERIZATION AND *IN VITRO* EVALUATION AS POTENTIAL UREASE INHIBITORS. The increase in food production to meet the demand of the world's growing population is largely conditioned by the efficiency of agricultural fertilizers. The development of relatively low-cost urease inhibitors and more environmentally friendly ones is a challenge for agriculture, especially because urea is the most used nitrogen fertilizer globally. The pyrolytic acid (PA), a by-product of wood charcoal production, stimulates plant growth, increases crop productivity, improves microbial metabolism, and induces plant tolerance to (a)biotic stresses. This work investigated the *in vitro* urease inhibitory potential of tree PAs of distinct plant biomass origin and production process. Coconut (*Cocos nucifera*) shell PA showed the highest urease inhibitory activity, followed by black wattle (*Acacia mearnsii*) PA and eucalyptus (*Eucalyptus urograndis*, a hybrid of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla*). The same sequence was observed for the content of phenols and humic substances (humic acids + fulvic acids). This fact probably justifies the greater inhibitory activity, since both humic substances and some phenols normally present in PA, such as hydroquinone, have already been reported in the literature as urease inhibitors. The results are promising in terms of urease inhibition by PA samples, especially due to its low cost, biodegradability, non-toxicity, high solubility in water, and beneficial effects on plant development.

Keywords: pyrolytic acid; urease inhibitors; wood vinegar; physical-chemical characterization; biostimulant.

INTRODUÇÃO

A expectativa de crescimento da população mundial para 8,5 bilhões de pessoas até 2030, apresenta-se como um desafio para o setor agrícola, uma vez que se projeta uma necessidade de expansão da produção de alimentos em 35%, para o mesmo período.¹ Nesse contexto, o Brasil terá um papel de protagonista, como um dos principais países produtores e exportadores deste setor. Estima-se que 87% do crescimento esperado para a produção agrícola global venha de melhorias no rendimento e eficácia da capacidade produtiva de alimentos.² Dessa forma, a busca por estratégias que aumentem o rendimento e a rentabilidade do produtor, ao passo que também fortaleçam a sustentabilidade do meio rural, são primordiais para que alcancemos as metas estabelecidas.

Dentre os insumos agrícolas de grande impacto na produtividade encontram-se os fertilizantes. No Brasil, o uso desses produtos para adubação aumentou em 87%, entre 2000 e 2015, contribuindo para o significativo crescimento da produção de grãos de 150%, experimentado no mesmo período.¹ Entretanto, a produção nacional de fertilizantes é historicamente muito inferior à demanda interna. Estima-se que, em 2020, mais de 80% desses insumos utilizados no Brasil foram importados,³ o que vem, ao longo dos anos, reforçando a dependência das importações. Um fator agravante está associado ao não aproveitamento integral dos fertilizantes aplicados, decorrente de perdas por lixiviação, volatilização, entre outras.

Os fertilizantes nitrogenados são os mais consumidos no mundo, sendo que mais de 50% desta classe é aplicada sob a forma de ureia. Ao ser aplicada ao solo, a ureia sofre hidrólise, resultando na formação de dois gases (amônia e dióxido de carbono) e água. Na presença da enzima urease, essa reação é cerca de 10⁴ vezes mais rápida.⁴ Por isso, grande parte do nitrogênio aplicado não é efetivamente aproveitada

pela planta, sendo perdida, principalmente, pela volatilização da amônia. Uma forma de evitar essas perdas é por meio da inibição da enzima urease. Outros métodos incluem, por exemplo, a associação da aplicação da ureia com períodos de chuva ou irrigação, promovendo o movimento da ureia para camadas mais profundas do solo. Entretanto, não são tão efetivos. Uma alternativa possível será apresentada nesse trabalho, envolvendo um coproduto da atividade de carvoejamento, denominado extrato pirolenhoso (EP).

O Brasil é o maior produtor de carvão vegetal do mundo e, consequentemente, o país com maior potencial para produção de EP. Diversos estudos sobre a utilização do EP na agricultura relatam efeitos benéficos no crescimento vegetal,⁵ na produtividade,⁶ na indução de resistência,^{7,8} no enraizamento,⁹ no desenvolvimento da microbiota benéfica do solo,⁹ na repelência de insetos,^{10,11} na germinação das sementes^{12,13} e na compostagem.¹⁴ A coleta do EP nas carvoarias envolve a condensação da fumaça liberada na pirólise da madeira, contribuindo com a redução de emissões e garantindo melhorias tanto ambientais quanto sociais.

O EP de eucalipto produzido em fornos de alvenaria é o tipo de EP de maior oferta no Brasil. O eucalipto corresponde a 76,9% de toda a área estimada de florestas plantadas no país (dados de 2021)¹⁵ e os fornos de alvenaria são os mais utilizados para produção de carvão vegetal.¹⁶ Nesses fornos a carbonização (pirólise lenta) dura em média três a quatro dias. A acácia negra é uma outra espécie de madeira dura com cultivo comercial, utilizada na produção de carvão vegetal, principalmente, no sul do Brasil, embora em escala muito inferior ao eucalipto. O carvão de acácia negra é destinado, em sua maioria, ao consumo residencial em churrasqueiras. De acordo com a Embrapa, estima-se que a casca de coco corresponda a cerca de 70% de todo lixo gerado nas praias brasileiras.¹⁷ Um dos destinos para esse resíduo é a produção de carvão vegetal para briquete e carvão ativado. Em geral, a carbonização da casca de coco se dá em fornos metálicos, de forma mais rápida (30 h), em relação aos fornos de alvenaria.

*e-mail: adefatima@qui.ufmg.br