



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
UNIDADE ACADÊMICA ESPECIALIZADA EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS-UAECIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS



POTENCIAL ANTIBACTERIANO E ANTIFÚNGICO DO EXTRATO PIROLENHOSO

EDUARDO DE SOUZA ARAÚJO

Macaíba – RN

2018

EDUARDO DE SOUZA ARAÚJO

POTENCIAL ANTIBACTERIANO E ANTIFÚNGICO DO EXTRATO PIROLENHOSO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador:

Prof. Dr. Alexandre Santos Pimenta

Macaíba – RN

2018

Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN
Sistema de Bibliotecas – SISBI
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN
Biblioteca Setorial Prof. Rodolfo Helinski
Escola Agrícola de Jundiá - EAJ

Araújo, Eduardo de Souza.

Potencial antibacteriano e antifúngico do extrato pirolenhoso

/ Eduardo de Souza Araújo. - 2018.

49f.: il.

Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias - UAECIA. Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, Macaíba, RN, 2018.

1. Antimicrobianos naturais - Dissertação. 2. Fármacos alternativos - Dissertação. 3. Pirólise controlada - Dissertação. 4. Vinagre de madeira - Dissertação. I. Pimenta, Alexandre Santos. II. Título.

RN/UF/BSPR

CDU 674

POTENCIAL ANTIBACTERIANO E ANTIFÚNGICO DO EXTRATO PIROLENHOSO

Eduardo de Souza Araújo

Dissertação julgada para obtenção do título de Mestre em Ciências Florestais (Área de Concentração em Ciências Florestais; Linha de Pesquisa de Manejo e Utilização dos Recursos Florestais) e aprovada pela banca examinadora em 28 de fevereiro de 2018.

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Alexandre Santos Pimenta – UFRN/UAECIA
Presidente



Prof^a. Dr^a. Tatiane K. B. de Azevedo Carnaval – UFRN/UAECIA
Examinador interno



Prof^a. Dr^a. Nilza Dutra Alves – UFERSA
Examinador externo à instituição



Prof. Dr. Francisco M. C. Feijó - UFERSA
Examinador externo à instituição

Macaíba – RN

2018

DEDICO:

À minha família, por sempre ter acreditado e investido em mim. Mãe, seus cuidados e dedicação foi que deram, em alguns momentos, a esperança para seguir e nunca desistir. Pai, sua presença viva sempre em meu coração representou segurança e certeza de que não estou sozinho em minha caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço este trabalho primeiramente a Deus, por ter me concedido saúde e força espiritual para que eu pudesse desenvolver este trabalho. Foi ele que sempre iluminou meus caminhos a cada momento, com amor e sabedoria para alcançar mais uma graça.

Ao meu amado e saudoso Pai Severino (em memória), que esteve sempre presente em minha memória e em meu coração, me dando forças e inspiração, para ultrapassar mais esta etapa no caminho do conhecimento e da qualificação profissional.

A minha querida mãe Nisarte, sempre me apoiando e me dando forças com suas orações que me deram animo para não desisti, sei que sempre estará ao meu lado apoiando e vibrando com as minhas conquistas.

Aos meus irmãos, Ricardo, Cláudio, Natalia e Silvânia por sempre se fazerem presentes em minha formação profissional e pessoal, me fortalecendo em família nos momentos difíceis e me auxiliando direta ou indiretamente para a conclusão de mais este capítulo na minha trajetória de vida.

Ao Professor Dr. Alexandre Santos Pimenta, meu orientador, que com toda paciência esclareceu dúvidas, aconselhou nas decisões, indicou os caminhos a serem percorridos; por todo apoio recebido, tanto profissional quanto pessoal, meu muito obrigado.

Aos meus co-orientadores a Dr^a. Nilza e o Dr. Marlon por todo apoio e empenho na execução deste trabalho, meu muito obrigado por acompanhar minha trajetória desde a graduação.

Em especial a minha esposa Hirlaine e minha filha Hiasmin que preencheram minha vida com amor e motivação para alcançar meus objetivos, sem nunca desistindo do sonho de contribuir para um mundo melhor.

Ao meu amigo Dr. Caio Sérgio Santos por toda ajuda e dedicação na condução dos experimentos no Laboratório de Microbiologia Veterinária da UFERSA, aos integrantes do Laboratório de Tecnologia da Madeira, todos contribuíram de uma forma ou de outra para a conquista deste trabalho, com todas as dificuldades compartilhadas neste período de conhecimento e aprendizado.

RESUMO GERAL

POTENCIAL ANTIBACTERIANO E ANTIFÚNGICO DO EXTRATO PIROLENHOSO

O presente trabalho fez uso da madeira de *Mimosa tenuiflora* e de um híbrido de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* que resultou no *Eucalyptus urograndis*, para produzir ácido de madeira através da pirolise lenta destas madeiras, que teve seu potencial de inibição testado frente a bactérias e fungos, onde foi padronizada a taxa de aquecimento de 1,25 ° C / min até 450 ° C para a coleta da fumaça da pirolise que obtivemos através da condensação, para obter produtos líquidos que submetemos a processo de purificação por meio da bi destilação em vácuo de 5 mmHg, obtendo-se um produto livre de impurezas, entre elas principalmente o alcatrão. A *Mimosa tenuiflora* e o *Eucalyptus urograndis*, foram utilizados por serem bastante difundidos no Nordeste e por quase todo território brasileiro. As amostras de estirpes resistentes a antibióticos diversos de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, tiveram sua sensibilidade testada frente à PA, por meio de avaliação usando o teste de difusão em ágar, utilizando-se a mesma metodologia avaliou-se também duas leveduras, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. Foram realizadas cromatografia gasosa com espectrômetro de massa em ambas as PAs sendo obtida sua composição química. Foram observados uma faixa de 15 a 25 mm de diâmetro nos halos de inibição formados. Foram analisadas a igualdade de parâmetros em equações ortogonais polinomiais, os modelos também foram ajustados, com o diâmetro de halos de inibição e concentração de PA (100, 50 e 20%) como parâmetros, os modelos foram ajustados por análise de regressão. Para tentarmos concluir se todos os microrganismos serão inibidos mesmo na menor concentração que foi de 20%, para ambas as PAs testadas, comprovar se o híbridos de *Eucalyptus urograndis* e *Mimosa tenuiflora*, tem potencial real para produção de agentes antibacterianos e antifúngicos naturais, através do aproveitamento de um subproduto da madeira oriundo da condensação da fumaça produzida em sua queima para produção de energia, já que são plantada em larga escala no Brasil, queremos demonstrar o seu potencial frente aos atuais

agentes encontrados no mercado atual, sendo uma alternativa para as aplicações zootécnicas e veterinárias.

Palavras-chave: Antimicrobianos naturais, Fármacos alternativos, Pirólise controlada, Vinagre de madeira.

GENERAL ABSTRACT

POTENCIAL ANTIBACTERIANO E ANTIFÚNGICO DO EXTRATO PIROLENHOSO

Using *Mimosa tenuiflora* wood and a hybrid of *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* that resulted in *Eucalyptus urograndis*, to produce wood acid through the slow pyrolysis of these woods, which had its inhibition potential tested against bacteria and fungi, where it was standardized the heating rate from 1.25 ° C / min to 450 ° C for collecting the pyrolysis smoke obtained through its condensation to obtain liquid products which we subjected to the purification process by bi distillation under vacuum of 5 mmHg, obtaining a product free of impurities, among them mainly the tar. *Mimosa tenuiflora* and *Eucalyptus urograndis* were used because they are widespread in the northeast and almost all Brazilian territory. Samples of antibiotic-resistant strains other than *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* had their sensitivity tested against AP by means of an agar diffusion test using the same methodology. Two yeasts were also evaluated, *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. Gas chromatography with mass spectrometer was carried out in both PAs and its chemical composition was obtained. A range of 15 to 25 mm diameter was observed in the inhibition alloys formed. Equal parameters were analyzed in orthogonal polynomial equations, the models were also adjusted, with diameter of inhibition halos and concentration of PA (100, 50 and 20%) as parameters, the models were adjusted by regression analysis. It is concluded that all microorganisms were inhibited even at the lowest concentration of 20% for both PAs tested, proving that *Eucalyptus* hybrids have real potential for the production of natural antibacterial and antifungal agents, through the use of a sub - a direct product of the condensation of smoke, since they are planted on a large scale in Brazil, the potential against the current agents found in the current market has been demonstrated, being an alternative for zootechnical and veterinary applications.

Keywords: Natural antimicrobials, Alternative medicines, Controlled pyrolysis, Wood vinegar.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 01 |
| REFERÊNCIAS..... | 20 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 23 |
| 2.1 Capítulo 1. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIFÚNGICA DO ÁCIDO PIROLENHOSO DA MADEIRA DE <i>Eucalyptus urograndis</i> e <i>Mimosa tenuiflora</i> | 23 |
| ABSTRACT | 23 |
| INTRODUCTION..... | 24 |
| Material and methods | 27 |
| Production and purification of Pa's | 27 |
| GC/MS analysis of PA's..... | 28 |
| Evaluation of Antibacterial and Antifungal Activity..... | 28 |
| Results | 30 |
| Discussion | 34 |
| Acknowledgements | 43 |
| Conflict of Interest | 43 |
| 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 44 |
| References..... | 45 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Total ion chromatogram of <i>Eucalyptus urograndis</i> PA..... | 31 |
| Figura 2. Total ion chromatogram of <i>Mimosa tenuiflora</i> PA..... | 31 |
| Figura 3. Effect of concentration of <i>Mimosa tenuiflora</i> PA on growth of microorganisms..... | 36 |
| Figura 4. Effect of concentration of <i>Eucalyptus urograndis</i> PA on growth of microorganisms..... | 37 |
| Figura 5. Effect of concentration of PAs on growth of microorganisms (numbered from <i>i</i> to <i>v</i> , in roman numerals)..... | 43 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Gravimetric yields from carbonization of <i>Mimosa</i> and <i>Eucalyptus</i> | 30 |
| Tabela 2: Gravimetric yields in purified PA from vacuum distillation | 30 |
| Tabela 3: Main chemical compounds identified in <i>Eucalyptus urograndis</i> PA | 32 |
| Tabela 4: Diameter of inhibition halos for <i>Mimosa tenuiflora</i> and <i>Eucalyptus urograndis</i> PA's on microorganism growth | 34 |

LISTA DE ABREVIATURAS

° C - grau *Celsius*

mmHg - milímetro de mercúrio

PA - pyroligneous acid

PAs - pyroligneous acids

% - *por cento*

Dr. - doutor

± - mais ou menos

pH - *potencial hidrogeniônico*

E. Coli - *Escherichia. Coli*

P. aeruginosa - *Pseudomonas aeruginosa*

S. aureus - *Staphylococcus aureus*

C.albicans - *Candida albicans*

C. - *Cryptococcus neoforman*

ATCC - American Type Culture Collection

GC-MS - cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

µm – micrómetro

µL - microlitro

> - maior que

UFERSA - Universidade Federal Rural do Semi-Árido

BHI - brain heart infusion

ml - mililitro

mm – milímetro

NCG – non condensable gases

CNPq - Conselho Nacional de Pesquisas

1. INTRODUÇÃO

O homem vem produzindo o extrato pirolenhoso há milênios e fazendo a sua utilização, há relatos na China e na Índia, de que ele era usado para tratamento de doenças. Durante o século XVII na Europa já existiam relatos de destilação seca da madeira para se obter o alcatrão com aproveitamento de extrato pirolenhoso, mas a sua produção em larga escala só teve início em 1813, na Inglaterra, onde o produto era utilizado na coloração do linho. Foram divulgadas as primeiras pesquisas com o extrato pirolenhoso em 1874, no Japão. Em 1893, as pesquisas experimentais visavam à construção de fornos e técnicas de obtenção de óleo de terebentina e alcatrão. Após a Segunda Guerra mundial, iniciou-se o uso de extrato pirolenhoso na agricultura. Em 1945 foi lançado o primeiro livro com relatos de utilização do produto, intitulado “Fabricação e Utilização do Extrato Pirolenhoso, ” (CAMPOS, 2007, p. 02). No Brasil o pesquisador Dr. Shiro Miyasaka vem desenvolvendo estudos e divulgando a utilização do extrato pirolenhoso na agricultura, já há algumas décadas, (CAMPOS, 2007, p. 02). O primeiro passo para se obter um extrato pirolenhoso de qualidade é observar as melhores condições para a produção desse extrato, como a temperatura, por exemplo. Outros aspectos importantes estão ligados ao tipo de biomassa utilizada. Existem muitas espécies vegetais que podem ser tóxicas para os seres humanos, e essa toxidez é repassada para o extrato pirolenhoso, impossibilitando assim o seu uso na agricultura. A casca advinda de lavouras dessecadas também deve ser evitada, devido à contaminação existente pelo uso de herbicidas. O importante é evitar matéria-prima advinda de vegetais que receberam algum tratamento com agrotóxicos durante seu crescimento, (BORSUK, 2009, p. 02).

Recentemente introduzido no Brasil, o extrato pirolenhoso, subproduto obtido da produção de carvão vegetal, é um produto promissor para a utilização na agricultura (ZANETTI, 2003, p. 508). Fazendo uma alusão à bibliografia de Myasaka et al. (1999), com base em observações práticas, junto a agricultores, o produto repele pragas e previne algumas doenças em cultivos vegetais, (BORSUK, 2009, p. 02). Segundo Campos (2007, p. 02), atualmente, os principais países produtores do

ácido pirolenhoso são, o Japão, China, Indonésia, Malásia, Brasil e Chile, incluindo outros países no sudeste asiático e na América do Sul.

Apesar de parecer um processo simples, a técnica de extrair o extrato pirolenhoso passa por uma série de cuidados. O controle de temperatura é importante pelo fato de que em temperaturas inferiores a 80°C os vapores contêm muita água, produzindo assim um extrato diluído, e temperaturas acima de 150°C, o extrato produzido conterá muito alcatrão (MIYASAKA apud BORSUK, 2009, p. 02). O extrato pirolenhoso deve ser produzido com o máximo de cuidado e seguindo rigorosamente as suas recomendações de produção, pois um extrato pirolenhoso mal feito poderá conter muito alcatrão. A presença de alcatrão no líquido pirolenhoso o torna inviável para a utilização na agricultura, precisando assim se eliminar todas as impurezas, (BORSUK, 2009, p. 02). O produto obtido se separara em três camadas distintas. Sendo a primeira camada de 10% onde predominam os óleos vegetais, a segunda camada tem uma variação entre 60 e 75% de extrato pirolenhoso e na terceira camada que é de 20 a 30% predomina o alcatrão. O extrato pirolenhoso é a fração aquosa do líquido que é condensado, possuindo uma cor marrom, o alcatrão insolúvel apresenta uma coloração negra, que representa a fração inferior decantada, e os óleos vegetais leves que provém da camada superior do líquido decantado, (BORSUK, 2009, p. 02). Segundo Borsuk (2009, p. 02), para obtenção de um produto sem impurezas, recomenda-se a separação mais completa, a qual é obtida mediante a destilação do líquido condensado. Baseado na diferença de ponto de ebulição dos componentes do extrato, e sua pressão normal e subpressão. A temperatura de destilação deve ser de $115 \pm 5^\circ\text{C}$, sendo que os primeiros 10% e os últimos 10% devem ser descartados. Para este trabalho adotou-se a bi destilação para se obter um produto isento de resíduos de alcatrão nas amostras de extrato pirolenhoso. Dentre as propriedades do ácido pirolenhoso, que estão diretamente ligadas ao seu comportamento e eficiência nas mais variadas utilizações destacam-se a composição química, densidade, pH e viscosidade (Campos apud BORSUK, 2009, p. 02). Pela literatura, somente foram reconhecidos cerca de 56% dos componentes existentes no extrato pirolenhoso (BORSUK, 2009, p. 02). Segundo Miyasaka apud BORSUK (2009, p. 02), 42% do extrato pirolenhoso é o levoglucosan, um açúcar muito utilizado em Medicina e em farmacologia.

O extrato pirolenhoso pode ser utilizado para diversos fins na agricultura, como fertilizante orgânico, desinfetante de solo, nematicida e fungicida. Outros estudos mostraram os efeitos benéficos no desenvolvimento radicular e aumento no teor de brix (açúcar) nos frutos. Há indícios de que as características físicas e químicas, especialmente o conteúdo de substâncias com o potencial quelante do extrato pirolenhoso, poderiam potencializar a eficiência de produtos fitossanitários e a absorção de nutrientes em pulverizações foliares. Este produto adicionado à água em concentração variando de 5 a 20 cm³/dm³, quando aplicado no solo, melhora suas propriedades físicas, químicas e biológicas, proporciona aumento da população de organismos benéficos, como actinomicetos e micorrizas, favorecendo, portanto, a absorção de nutrientes do solo pelo sistema radicular das plantas. O ácido diluído em água em concentração de 1/500 a 1/1000 poderá ser adicionado a defensivos químicos, reduzindo a dosagem recomendada em 50%, sem prejuízo de sua eficiência. Entretanto, este produto não deve ser adicionado aos defensivos de natureza alcalina. O ácido pirolenhoso puro poderá ser adicionado a ração animal, numa proporção de 0,3% a 1%, proporcionando uma melhora na absorção dos nutrientes devido ao aumento da flora intestinal do animal. O ácido em solução aquosa de 1/50 também é utilizado sobre dejetos de animais, com a finalidade de eliminar o mau cheiro. Destacam-se outros usos do extrato entre eles: Quando adicionado a extratos vegetais de alho, mucuná, pimenta e nim, melhora o efeito no controle de pragas e doenças; quando diluído, convenientemente, ao ser pulverizado sobre a parte aérea das plantas, tornando-as mais vigorosas, melhorando a qualidade do produto quanto ao tamanho, coloração, sabor e durabilidade (Miyasaka apud BORSUK (2009, p. 02).

Além disso, o ácido pirolenhoso é considerado um produto promissor para utilização na agricultura no controle de pragas e doenças (ZANETTI et al., 2003, p. 508).

Uma grande fonte de pesquisa de tecnologias alternativas encontra-se nas plantas do semiárido. A história nos mostra que ao longo dos anos, as plantas foram os primeiros recursos terapêuticos utilizados, sendo em muitos momentos única forma de prevenção, tratamento e cura para a humanidade (DE MEDEIROS, 2013). Segundo Rodrigues (2001, p. 131), as bases da Medicina de Hipócrates no Brasil (460-377 a.C.), presentes na medicina popular, foram trazidas pelo colonizador europeu, porém este precisou aqui aprender com os indígenas o conhecimento sobre o uso de plantas nativas e demais recursos de sua medicina. As plantas vêm cada vez mais sendo pesquisadas com intuito de avaliar seu potencial farmacológico para a obtenção de novas substâncias, devido ao surgimento de novas cepas

resistentes aos diversos tipos de drogas existentes (ALBUQUERQUE; ANDRADE apud DE MEDEIROS, 2013, p. 17). A resistência antimicrobiana, juntamente com as limitações como custos e a demanda por tecnologias adequadas ao sistema de produção agroecológico, motivam o desenvolvimento de pesquisas buscando novos princípios ativos (PEREIRA, 2007, apud DE MEDEIROS, 2013, p. 18). A falta de estudos com o extrato pirolenhoso foi constatada através do levantamento feito no trabalho científico de Castanho et al. (2011), onde foram localizados alguns trabalhos de cunho científico, citando os tipos de cultivos e os campos de aplicação do produto (estimulante de crescimento, bioinseticida, biofungicida e funções nutricionais).

Atualmente, o uso indiscriminado de medicamentos tem causado resistência a diversas doenças causadas por bactérias e fungos e, desta forma, tem surgido um novo desafio para medicina, que vem buscando novos medicamentos que possam ter eficácia a estes agentes de interesse medico/veterinário. O desafio é encontrar produtos naturais como alternativa para a falta de fármacos capazes de combater as doenças modernas que afetam a população em decorrência da resistência de bactérias e fungos. Diante da escassez de medicamentos que possam combater tais doenças, como por exemplo, as causadas por bactérias como *Escherichia. coli*, e fúngicas como *Candida albicans*, vem-se pesquisando alternativas que possam fornecer novos medicamentos para a medicina moderna, através de pesquisas que possam trazer alternativas sustentáveis com o mínimo de agressão ao meio ambiente. Duas das bactérias muito utilizadas para avaliação de potenciais antimicrobianos são *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, que são conhecidas por serem causadoras de infecções hospitalares e apresentarem diversos fenótipos resistentes a antibióticos que usualmente são utilizados contra estas espécies. As bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus* estão comumente associadas a doenças respiratórias, intoxicações alimentares, patologias bucais e infecções urinárias (SANTOS et al., 2002; ANSOM et al., 2006; STEFANELLO et al., 2006; LIMA et al., 2007 apud ARAÚJO, et al. 2013).

A preocupação cada vez maior pela conservação do meio ambiente vem se destacando e mobilizando pequenos e grandes proprietários rurais. O Brasil vem ganhando destaque no setor rural (CAPOANE, 2008, apud CHIAMENTI, LISANDRA, et al. 2016), o que, somado ao crescimento da população e economia, se torna um

fator negativo ao meio ambiente, pois diversas alterações ambientais constatadas decorrem das atividades predatórias do homem (BENETTI et al., 2011, apud CHIAMENTI, LISANDRA, et al. 2016). Desta forma, é de suma importância a busca por melhorias para que as consequências deste crescimento não acarretem em maiores problemas futuros para o homem e o meio ambiente (CAPOANE, 2008, apud CHIAMENTI, LISANDRA, et al. 2016). O extrato pirolenhoso atrai cada vez mais a atenção de pesquisadores de diferentes áreas, por ser um produto útil desde a agricultura, como antifúngico (COSTA et al., 2003; BORTOLETTO et al., 2009, apud CHIAMENTI, LISANDRA, et al. 2016), controle de pragas (MAEKAWA, 2002; MIYSAKA, 2001, apud CHIAMENTI, LISANDRA, et al. 2016), adubo orgânico (MASCARENHAS et al., 2006, apud CHIAMENTI, LISANDRA, et al. 2016) até o setor público (CAMPOS, 2007; ENCARNAÇÃO, 2001, apud CHIAMENTI, LISANDRA, et al. 2016). Há relato, sem descrição de embasamento teórico e metodologia, de que o uso do licor pirolenhoso nas esterqueiras elimina o mau cheiro e as larvas de moscas e varejeiras, reduz praticamente todos os coliformes fecais e totais que transmitem doenças e, ainda, resulta num fertilizante orgânico de excelente qualidade com pH ideal para o solo (ENCARNAÇÃO, 2001, apud CHIAMENTI, LISANDRA, et al. 2016). Os ácidos orgânicos são comumente encontrados na natureza como componentes normais de tecidos animais e vegetais e já está estabelecido que estes possuem fortes propriedades antimicrobianas, sendo que seus efeitos podem ser explicados por diversos mecanismos, incluindo redução do pH e propriedades bacteriostáticas (BELLAVÉR & SCHEUERMANN, 2004, apud CHIAMENTI, LISANDRA, et al. 2016).

A *Candida albicans* é uma levedura comensal facilmente encontrada na mucosa bucal, trato gastrointestinal, trato urogenital e pele de seres humanos desde o nascimento. Em circunstâncias excepcionais quando ocorre uma desordem no equilíbrio biológico devido a fatores predisponentes - patológicos, fisiológicos, imunológicos e mecânicos – pode haver um aumento na multiplicação e invasão dos tecidos por estes micro-organismos, ocasionando infecções denominadas candidíases. (NAVES, 2013).

A criptococose é uma infecção causada pela levedura *Cryptococcus neoformans* e apresenta uma elevada predisposição para o sistema nervoso central (SNC). Este agente afeta principalmente os indivíduos

imunocomprometidos. Existem duas variedades de *C. neoformans*, *C. neoformans var. neoformans* e *C. neoformans var. gattii*, que podem causar infecção. A variante *gattii* encontra-se com maior frequência nas zonas tropicais ou subtropicais, tendo sido isolada em eucaliptos. Enquanto, que a *C. neoformans var. neoformans* habita em pombos e aves, e no solo contaminado por excrementos destes. A infecção dá-se através da inalação dos esporos, que originam uma infecção pulmonar assintomática após penetração nos alvéolos pulmonares. As manifestações clínicas variam desde uma simples colonização pulmonar até uma infecção disseminada e invasiva. A disseminação é por via hematogênica, e pode provocar lesões no SNC, cérebro e meninges e ainda lesões cutâneas, ósseas e viscerais (PALMEIRA 2014).

O licor pirolenhoso possui diversos ácidos orgânicos que são facilmente absorvidos pela parede celular das bactérias, podendo danificar a estrutura do DNA das células e, conseqüentemente, causando um efeito bacteriostático (inibição do crescimento) ou um efeito bactericida (morte bacteriana). Além disso, os ácidos reduzem o nível do pH da célula, obrigando-a utilizar sua energia para liberar os prótons, levando a uma exaustão celular (LANGHOUT, 2005, apud CHIAMENTI, LISANDRA, et al. 2016). Com isso, acredita-se que algum destes compostos químicos ou até mesmo a combinação destes componentes presentes no licor pirolenhoso atuaram sobre os coliformes dos dejetos suínos, inibindo seu crescimento, (CHIAMENTI, LISANDRA, et al. 2016).

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, A. P.; ANDRADE, L. H. C. Uso de recursos vegetais da caatinga: o caso do Agreste do estado de Pernambuco. *Revista de Ciencia y Tecnologia de América*.v. 27, n. 7, p. 336-346, 2002.

ANSOM, G. V.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de Dados Epidemiológicos Relativos à 11 Ocorrências/ Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (Dtas) no Estado do Paraná – Brasil, No Período De 1978 A 2000. **Ciências Agrotecnológica**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, 2006.

ARAÚJO, MARLON LIMA, et al. "Atividade antimicrobiana de óleos extraídos de açaí e de pupunha sobre o desenvolvimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*." *Bioscience Journal* 29.4 (2013).

AZEVEDO, M.M., RAMOS, I.F., CRUZ, L.C., VAZ, C.P. AND RODRIGUES, A.P. (2015) Genesis of azole antifungal resistance from agriculture to clinical settings. *J. Agric. Food Chem.*, **63**, 34, 7463-7468.

BELLAVER, C.; SCHEUERMANN, G. Aplicações dos ácidos orgânicos na produção de aves de corte. In: Feira da Indústria Latino-Americana de Aves e Suínos AveSui, 2004, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. **Anais...** Itu: Gessulli, 2004. p.1-16.

BENETTI, J.E. et al. Diagnóstico da gestão ambiental à luz do Tratado de Kyoto: O caso da Unidade Produtora de Leitões. **Revista de Contabilidade e Controladoria**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, v. 3, n.1, p. 96-110, jan./abr. 2011.

BORSUK, ALAN CASSIO. Um estudo sobre o ácido pirolenhoso, com ênfase na técnica de obtenção e aplicação na agroecologia. Videira, Santa Catarina: Universidade do Oeste de Santa Catarina, 2009. 27 p.

BORTOLETTO, M. et al. Efeito do extrato pirolenhoso de *Eucalyptus* spp. no desenvolvimento de *Arthobotrys musiforme* in vitro. In: Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo (SIICUSP), 17, 2009, São Paulo. **Anais...** São Paulo: USP, 2009.

CAMPOS, A. D. (2007). Técnicas para produção de extrato pirolenhoso para uso agrícola. Pelotas-RS, Brazil, EMBRAPA (Empresa Brasileira de Agropecuária), Circular Técnica n. 65 Embrapa, 2007.

CAMPOS, Â. D. Técnicas para produção de extrato pirolenhoso para uso agrícola. **Embrapa Clima Temperado - Circular Técnica**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Pelotas, n. 65, p.1-8, 2007.

CAPOANE, V. **Poluição hídrica por dejetos de suínos**: um estudo de caso na micro bacia do Arroio Caldeirão – Palmitinho – RS. 2008. 87 f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Geografia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

CASTANHO, R.M.; BRITO, J.O.; ALMEIDA, R. Levantamento bibliográfico sobre uso de pirolenhoso na agricultura brasileira. 19 SIICUSP – Simpósio Internacional de Iniciação Científica de 21 a 25 de novembro de 2011.

CHIAMENTI, LISANDRA, et al. "Ação antibacteriana do licor pirolenhoso sobre coliformes." *Revista Conhecimento Online* 2 (2016): 47-54.

COSTA, A.F. et al. Estudo Comparativo entre produtos químicos preservantes e licores pirolenhosos na inibição de fungos emboloradores. **Revista Brasil Florestal**, Brasília, n. 75, p. 23-30, jan. 2003.

DE MEDEIROS, ANNA JACINTA DANTAS. "Aspectos tecnológicos e sociais do potencial antimicrobiano de plantas do semiárido sobre cepas bacterianas isoladas de caprinos." (2013).

ENCARNAÇÃO, F. Redução do impacto ambiental na produção de carvão vegetal e obtenção do ácido pirolenhoso como alternativa para proteção de plantas. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, Porto Alegre, v. 2, n. 4, p. 20-23, out./dez. 2001.

LANGHOUT, P. Alternativas ao uso de quimioterápicos na dieta de aves: a visão da indústria e recentes avanços. In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2005, Santos, SP. **Anais...** Santos: Apinco, 2005. p.21-33.

LIMA, M. E.; ANDRADE, D.; HAAS, V. J. Avaliação Prospectiva da Ocorrência de Infecção em Pacientes Críticos de Unidade de Terapia Intensiva. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, São Paulo, v. 19, n. 3, 2007.

MAEKAWA, K. **Curso sobre produção de carvão, extrato pirolenhoso e seu uso na agricultura**. Botucatu: APAN - Associação dos Produtores de Agricultura Natural, 2002. Apostila.

MASCARENHAS, M.H. et al. Efeito da utilização do extrato pirolenhoso na produtividade de alface. **Revista Brasileira de Horticultura**, v. 24, n. 1. p. 3122 - 3125, 2006 a. Disponível em: <http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivos/Download/Biblioteca/46_0773.pdf>. Acesso em:04 set. 2010.

MIYASAKA, SHIRO; OHKAWARA, TAKEMI; UTSUMI, BEATRIZ. Ácido pirolenhoso: uso e fabricação. Boletim Agroecológico. Nº14. Dezembro de 1999.

NAVES, PLÍNIO LÁZARO FALEIRO, et al. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. Revista de Ciências Médicas e Biológicas, 2013, 12.2: 229-233.

PALMEIRA, SARA JOSÉ GUIOMAR. *Micoses sistêmicas*. MS thesis. 2014.

PEREIRA, M S. V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 17, n. 4, p. 572-577, 2007.

RODRIGUES, A.G. Buscando raízes. Horizontes Antropológicos, v.7, n.16, p.131-144, 2001.

SANTOS, S. S. F.; LOBERTO, J. C. S.; MARTINS, C. A. P.; JORGE, A. O. C. Prevalência e sensibilidade in vitro de enterobacteriaceae e pseudomonas isoladas da cavidade bucal e bolsa periodontal de pacientes com periodontite crônica. **Pós-Graduação Revista Faculdade Odontológica, São José dos Campos**, v. 5, n. 2, 2002.

STEFANELLO, M. E. A., SALVADOR, M. J., ITO, I. Y., & MACARI, P. A. (2006). Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa*. *Rev bras farmacogn*, 16(4), 525-530.

ZANETTI, M.; CAZETTA, J. O.; MATTOS JR., D.; CARVALHO, S. A. Uso de subprodutos de carvão vegetal na formação do porta-enxerto limoeiro 'cravo' em ambiente protegido. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, SP, v. 25, n. 3, p. 508 - 512, 2003.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Capítulo 1: ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIFÚNGICA DO ÁCIDO PIROLENHOSO DA MADEIRA DE *Eucalyptus urograndis* e *Mimosa tenuiflora*

Artigo submetido à Revista; Journal of Applied Microbiology (Qualis CAPES B1)

Abstract:

Aims: The present work aimed to evaluate the antibacterial and antifungal activity of two types of pyrolygneous acid (PA) obtained from slow pyrolysis of wood of *Mimosa tenuiflora* and of a hybrid of *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*.

Methods and Results: Wood wedges were carbonized on a heating rate of 1.25°C/min until 450°C. Pyrolysis smoke was trapped and condensed to yield liquid products. Crude pyrolysis liquids were bi-distilled under 5 mmHg vacuum yielding purified PA. Multi-antibiotic resistant strains of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) had their sensitivity to PA evaluated by using agar diffusion test. Two yeasts were evaluated as well, *Candida albicans* (ATCC 10231) and *Cryptococcus neoformans*. GC-MS analysis of both PA's was carried out in order to obtain their chemical composition.

Regression analysis was performed and models were adjusted, with diameter of inhibition halos and PA concentration (100, 50 and 20%) as parameters. Identity of regression models and equality of parameters in polynomial orthogonal equations were verified. Inhibition halos were observed in the range 15 to 25 mm of diameter.

Conclusions: All microorganisms were inhibited by both types of PA even in the lowest concentration of 20%.

Significance and Impact of Study: The feasibility the usage of PAs produced with wood species planted in large scale in Brazil was evident and the real potential as a basis to produce natural antibacterial and antifungal agents, with real possibility to be used in veterinary and zootechnical applications.

Keywords: Alternative antimicrobials, Pathogenic microorganisms, Slow pyrolysis, Pyroligenous acid

Introduction

The terms pyroligneous acid or wood vinegar are synonymous and used to define the aqueous fraction obtained from carbonization or slow pyrolysis of wood and other lignocellulosic raw materials. Typically, carbonization of wood produces charcoal, non-condensable gases, tar and pyroligneous acid (hereafter referred to as PA). Yields can vary widely depending on the type of wood and the process conditions, such as final temperature and heating rate (Yoshimoto, 1994; Santos et al., 2013). PA is recovered from carbonization process by trapping the pyrolysis gases through a proper condensing unit. After some time, that might vary from days to even a few months, wood tar, which is a heavier fraction, decants at the bottom of the container and separates from PA.

Several research efforts has been made in order to better know the chemical composition of PA and more than 200 major compounds have been identified in variable concentrations. Chemical composition and concentration of compounds intrinsically depend on which original material is charred (Pimenta et al., 2000; Nakai et al., 2007; Rakmai, 2009; Souza et al., 2012). Major components include formic, acetic, propionic and valeric acids; methanol, butanol and amylic alcohol; phenol and cresols besides guaiacol and syringol derivatives; neutral compounds such as formaldehyde, acetone, furfural e valerolactone; among several others, as maltol, cyclotene etc.

Some research works carried out in Japan showed the efficiency of PA as a fungal and bacterial disease preventer in crops (Campos, 2007). PA has been well established for agricultural use in Japan and China since the 1930 decade (Tiilikkala et al, 2010). The following effects and properties are reported: soil conditioning, favoring the development of microbiota (Yoshimoto, 1994; Steiner, 2008; Togoro et al., 2014); use in plants pest control and management, pure (Souza et al., 2007; Tiilikkala et al., 2010) or in combination with conventional pesticides (Busoli et al., 2004; Thuler et al., 2007; Kim et al., 2008); appliance of PA in plants diseases caused by bacteria or fungus (Yoshimoto, 1994; Jung, 2007; Payamara, 2011). Also,

the use of PA is cited as a plant growth enhancer, stimulating significantly the development of roots, stems, leaves, flower, tubers and fruits, and likewise improving the sweet taste of the latter (Yoshimoto, 1994; Zulkarami et al., 2011; Kang et al., 2012); and moreover as a herbicide (Tiilikkala et al., 2010).

Another research line about PA is focused on its usage as a supplement in ruminant and monogastric animals feeding, favoring ruminal and intestinal flora and additionally improving digestibility and nutrient absorption (Li et al., 2001; Kook, et al., 2002; Kook et al., 2003). PA was successfully used to substitute a conventional antibiotic (aparamicin) in weanling pigs feeding, as reported by Choi et al. (2003). According to these authors, higher populations of *Lactobacillus* were noted in the intestines of pigs fed with PA and a concomitant reduction in the population of harmful coliforms was verified as well. Such research line is rather important since the addition of antibiotics on animal feed is considered a practice to be restrained in the forthcoming years. As Nachman (2016) points out, the misuse of antibiotics in feeding of pigs is accredited to be responsible for a crescent spread of multi-antibiotic resistant bacteria, some of them able to hold out even some of the last-resort antibiotics. According to Vandeputte et al. (2012), the phenomenon of antifungal drugs resistance showed an expressive rise since the late 1960s and it is nowadays a serious concern in clinical practice. In both the agricultural and the medical area, an increasing antifungal resistance, from the 1960 decade to the present day, is highlighted by Azevedo et al. (2015).

Historical references (Doran, 1932 and Yantorno, 1933) showed comments that suggest PA as worthy in having properties to be evaluated more closely. The use of PA as soil disinfectant was established by Doran (1932). According Yantorno (1933), by the end of XIX century and in the early XX century, pure and diluted PA were used in Europe and South America in controlling veterinary diseases such as avian influenza and cholera, wounds in horses and even in medical field being prescribed to eczemas and intestinal infections. In recent times, the potential use of PA as an alternative antibacterial and antifungal agent has been corroborated by consistent results from research efforts. Additionally, PA is cited as being efficient as antioxidant, antiseptic, anti-inflammatory, anti-allergic and detoxifying agent (Yin, 2008). Watarai and Koiwa (2008) reported the combination of PA and activated charcoal as an effective anti-protozoal agent. Other positive properties are

highlighted, and as an example, Pereira et al. (2007) described a positive antifungal activity of crude PA on several species of *Candida*. The antimicrobial effect of three types of PA on bacteria and fungus that cause dermatitis was reported by Rakmai (2009). Another work carried out by Melo et al. (2007) found effective bactericidal properties of PA on species of *Pseudomonas* and *Serratia*. Also Silva et al. (2007) reported the same effect of PA on *Escherichia Coli* and *Klebsiella* sp. In the same research field, Chan et al. (2012) reported the antibacterial effect of distilled and non-distilled PA on growing of gram-positive and gram-negative bacteria. Also Ibrahim et al. (2013) verified the effectiveness of PA as inhibitor on growing of *Candida albicans*, demonstrating by electron scanning microscopy the standout damages on cell walls caused by the product. All of those results herein summarized show undoubtedly that further research should be made on PA's chemical composition in order to know which are responsible for the antibacterial and antifungal effect.

Having in mind the issue of drug resistance of bacteria and fungus, it is important to know that PA is likely to act as a natural antibacterial and antifungal agent and in some replace the conventional drugs. However, despite of confirming the real potential of PA as an anti-bacterial and anti-fungal agent and its power to replace conventional drugs in specific cases, the several works herein cited do not specify in a clear way what carbonization parameters were used for obtaining PA fraction, such as final temperature and heating rate. Similarly, such works do not inform exactly the method used for purification of PA in order to remove all traces of tar. The present work aims to fill this gap, informing in a clear way the conditions of obtaining PA, as well as the standardized method used for its purification. The carbonized wood species for producing PA, *Mimosa tenuiflora* and a clone of *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*, respectively, are important in the semiarid area of the Northeast Region of Brazil because they are profusely used on forestation and revegetation of degraded areas and are species particularly indicated to biomass energy usages as firewood and for charcoal production because of their high specific density.

PAs were obtained from slow pyrolysis of wood of *Mimosa tenuiflora* and *Eucalyptus*, and the resulting liquid products were purified by vacuum distillation. Then, their antimicrobial activity was evaluated. The main goal of the present work

was to test the antibacterial and antifungal effect of two PAs and its specific goal was to assess the applicability of the statistical identity test of quadratic linear models to compare the effects of PAs on the microorganisms studied here.

Material and methods

Production and purification of PA's

The wood of *Mimosa tenuiflora* was obtained from natural populations of the forest reserve of the Agricultural Sciences Unit of Federal University of Rio Grande do Norte located in Macaíba, state of Rio Grande do Norte. The wood of eucalypt (an hybrid of *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*, cited in Brazil as *urograndis*) was collected from clonal planted forests located at the same region. The procedures for logs collection and wood sampling followed the methodology described by Santos et al. (2013). Wood samples consisted of 2 cm-thick disks divided in four wedges each one. Wood wedges were oven dried for 48 hours at $103 \pm 1^\circ\text{C}$. After placed in a metallic container, batches of about 500 g of wood wedges were carbonized by using a laboratory furnace. The furnace was equipped with a device designed to trap and collect the condensable portion from pyrolysis smoke, and during all carbonization runs, the condenser was water cooled and maintained at 25°C . Thirty charring runs were carried out for each wood species at a heating rate of $1.25^\circ\text{C}/\text{min}$ until the final temperature of 450°C , which was held for 30 min. After the charring runs were concluded, the total condensed liquids were immediately stored under refrigeration at 2°C for further use. For each wood species, the liquids from 30 pyrolysis runs were put together forming two composite samples. From the experimental data, the yields in charcoal, total condensed liquids and non-condensable gases (NCG) were determined. Yields of NCG were obtained by weight difference. Then, composite samples of condensed liquids from *Mimosa* and *Eucalyptus* were bi-distilled under a 1.0 mm HG vacuum at 100°C to obtain the respective purified PAs, and the distillation was interrupted as soon as the temperature reached 105°C . Wood tar and heavy oils from each distillation were properly discarded. Experimental data from charring runs and vacuum distillations were submitted to variance analysis and the means were compared by F test at 5% of significance.

GC/MS analysis of PA's

After preliminary optimization tests, the following procedure of extraction was standardized. To aliquots of 5 mL of both samples of *Mimosa tenuiflora* and *Eucalyptus urograndis* PA's were firstly added 1.5 mL of concentrated ammonium hydroxide (Caledon, Ammonia Solution UN 2672, Canada) to increase the pH to around 5 and decrease the concentration of acetic acid of the samples. Then, one extraction was carried out using 3 mL of ethyl acetate (HPLC grade, Tedia, Brazil). After the liquid-liquid extraction, 1 mL of the organic fraction was transferred to a GC vial before further analysis.

The GC-MS analyses of the samples were carried out on a Shimadzu QP 2010. The separation was performed in a CP-Wax column 52 DB (Restek, 30-m length, 0.25-mm diameter, 0.25- μ m film thickness), keeping injector temperature at 250 °C. After being carried out several runs in order to achieve the best separation of compounds, the following routine of chromatographic analysis was defined. The samples (1 μ L) were injected in a split ratio of 1:10, and the oven temperature program was as follows: 50 °C for 2 min, 2 °C min⁻¹ from 50 to 240 °C, holding for 2 min. Helium was used as a carrier gas at a constant flow rate of 1 mL min⁻¹. Major (> 20 % area) and minor compounds (> 0.02%) were detected and identified based on their characteristic mass spectra by comparison with NIST library. All of the chemical compounds reported herein had mass spectrum similarity at least above 80%.

Evaluation of Antibacterial and Antifungal Activity

The sensitivity of both bacteria and yeast to PAs were evaluated by carrying out *in vitro* tests using the agar diffusion method (well diffusion method), basically following the standard procedures published by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and adopted by the National Health Surveillance Agency of Brazil (ANVISA). The following multi-antibiotic resistant bacteria had their sensitivity examined: nineteen strains of *Escherichia coli* isolated from patients with urinary infection and released by the Opinion Ethical Committee number 524.469 (Federal University of Semiarid – UFERSA), one strain of *Staphylococcus*

aureus (ATCC 25923) and one strain of *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), from the American Type Culture Collection (ATCC). Additionally, two yeasts were evaluated: *Candida albicans* (ATCC 10231), from the American Type Culture Collection (ATCC), and *Cryptococcus neoformans*, isolated from a stray cat. All microorganisms were stored in BHI broth covered with glycerin prior to use, then spread in BHI broth and incubated for 24 hours at 35°C before inoculation. By using an automatic pipette, aliquots were taken out from the stored cultures and they were transferred to assay tubes containing a sterile saline solution (0.85%) until the turbidity reached 0.5 according to the McFarland scale (bacterial density of 1.5×10^8 cell.mL⁻¹). The concentration of each inoculum was checked over by comparison with McFarland turbidity standards (Remel, USA) as reference. Then, a volume of 50 µL of each inoculum was incorporated in 10 mL of molten Mueller-Hinton agar and shortly thereafter the mixture was set and in 90 mm Petri dishes. Three mm diameter wells were punched into the agar with sterilized borers and, after that, the well bottoms were covered with liquid agar solution to prevent leakage of PAs by infiltration under the substrate. PA aliquots of 50 µL were carefully added in the identified wells. Three concentrations of each PA diluted in distilled water were tested, respectively, 100 (pure product), 50 and 20%. Gentamicin was used as a control antibiotic for bacteria in and distilled water as a control for all microorganisms in separate plates. Distilled water was added to the cultures without wells perforation. The Petri dishes were incubated at 35±1°C for 24 hours. After this time, the diameter of inhibition halos was measured without considering the well diameter in the measures. Only halos with diameter higher than 10 mm were considered as inhibition.

The experimental data were submitted to regression analysis by using the Statistica software (Statsoft, 2015), and for each combination of microorganisms and type of PA, a linear quadratic model was adjusted as follows:

$$y = \beta_0 + \beta_1 X + \varepsilon$$

.....(eq.1)

The simple linear model showed above relates inhibition halos (y , in mm) as a function of PA concentration (X , in %), and ε is the experimental error. The simple linear models were adjusted as suggested by Gujarati & Porter (2009) who preconize that unknown trends between experimental data or even data with a trend

not strictly close to linear can be submitted to regression analysis and linear models can be adjusted from them. After equations adjustment, they were compared by the statistical models identity according the method preconized by Regazzi (1993, 1996). Such procedure aimed to verify the identity of regression models and equality of parameters in the polynomial orthogonal models and which is suitable to compare different organisms under the same external factor or condition and the effect of two or more factor on an individual organisms. Then, two types of statistical approach were considered: the first one compared the identity of models adjusted for each microorganism inside both types of PA, to evaluate if the response of microorganisms to PAs is statistically equal or different; the second approach compared if the effect of both PAs is equal or different for each microorganism separately.

Results

Production and purification of Pas

Gravimetric yields (GY) from carbonization runs for both woods, as charcoal, total condensed liquids (crude PA) and non-condensable gases (NCG) are showed in Table 1.

Table 1: Gravimetric yields from carbonization of *Mimosa* and *Eucalyptus*.

| Gravimetric Yields (%) | | | |
|------------------------|----------|-------------------------|--------|
| Species | Charcoal | Total Condensed Liquids | NCG |
| <i>Mimosa</i> | 44.8 a | 30.5 b | 24.7 a |
| <i>Eucalyptus</i> | 39.3 b | 37.8 a | 22.9 a |

In each column, means followed by same letters are statistically equal by F test at the 5% level

Results obtained from charring runs showed that *Mimosa* had statistically higher yields in charcoal and lower in total condensed liquids (crude PA) in comparison to *Eucalyptus*. However, the NCG yields were statistically equal. For

both species, results agree with experimental data reported by Oliveira et al. (2006), Pereira et al. (2013) and Santos et al. (2013), that stated the higher resistance of *Mimosa* wood to thermal degradation as a function of its higher lignin content and specific density. Nevertheless, despite the difference, both charcoal yields are acceptable in terms of industrial charcoal making. In the Table 2 are showed the gravimetric yields in purified PA achieved on vacuum distillation for both crude PA's (total pyrolysis liquids) of *Mimosa* and *Eucalyptus*.

Table 2: Gravimetric yields in purified PA from vacuum distillation.

| Species | Gravimetric Yields (%) | |
|-------------------|------------------------|--------------------------------|
| | Based on TPL* mass | Based on initial dry wood mass |
| <i>Mimosa</i> | 78.1 a | 23.8 b |
| <i>Eucalyptus</i> | 70.5 b | 26.7 a |

In each column, means followed by different letters differ significantly by F test at the 5% level *Total pyrolysis liquids

Results attained for purification of crude PAs are statistically different and are superior to *Mimosa*, what can be explained by its higher resistance to thermal degradation. The higher the thermal resistance the lower the heavy oils and tar content in the total pyrolysis liquids (Santos et al., 2013), leading to higher amounts of available aqueous fraction, purified PA. Even though PAs yields are different, they are close, what is satisfactory for commercial purposes.

The Figures 1 and 2 show the total ion chromatograms of *Eucalyptus urograndis* and *Mimosa tenuiflora* PA's.

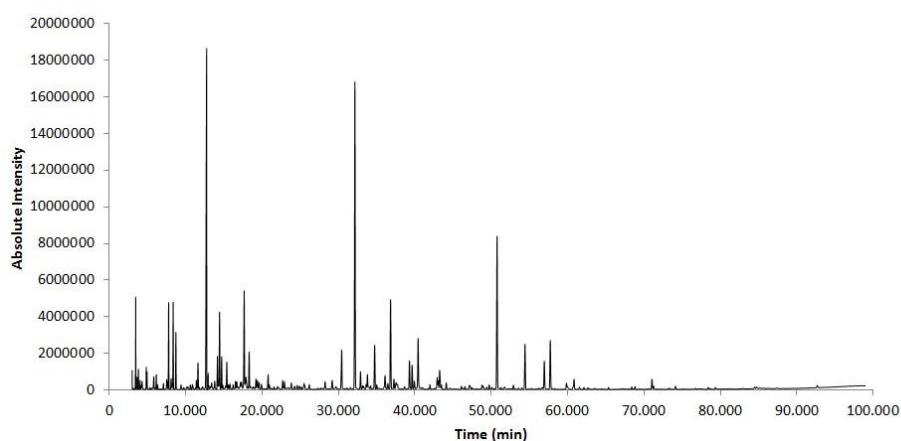


Figure 1: Total ion chromatogram of *Eucalyptus urograndis* PA

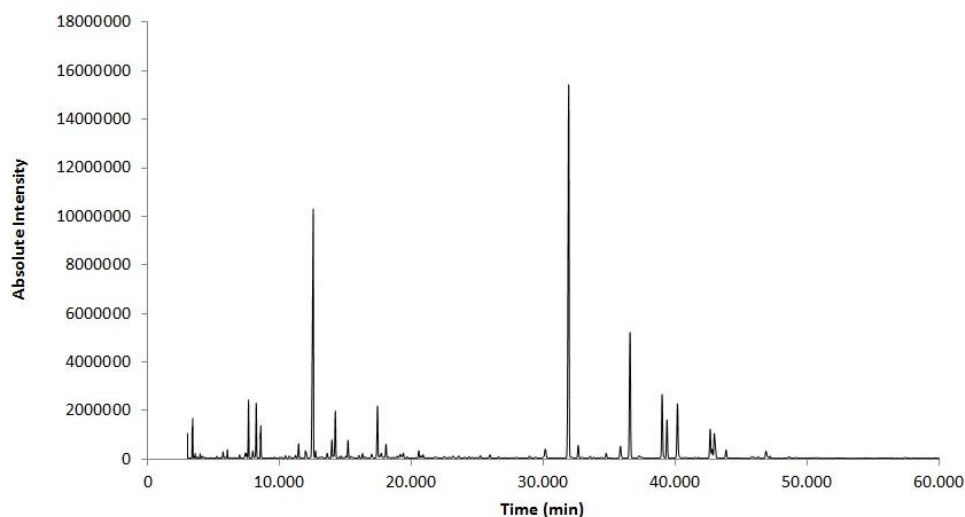


Figure 2: Total ion chromatogram of *Mimosa tenuiflora* PA

The Table 3 shows the main chemical compounds identified in *Eucalyptus urograndis* PA. Both PA's have a similar chemical composition however on different concentrations. A complete list of chemical components for both PA's is provided in a supplementary file. An amount of 84 and 97 chemical compounds were identified on *Eucalyptus urograndis* and *Mimosa tenuiflora*, respectively. Furfural and phenols are the predominant compounds on both PA's. For *Eucalyptus urograndis* PA, furfural and phenols represent 15.75 and 44.04%, respectively, of the total chemical composition. In turn, for *Mimosa tenuiflora* PA the same compounds represent 17.43 and 56.36%, respectively.

Table 3 – Main chemical compounds identified in *Eucalyptus urograndis* PA

| Peak | Ret time | Area % | Compound | Similarity | Average mass (Da) | Molecular Formula |
|------|----------|--------|---|------------|-------------------|---|
| 1 | 3.467 | 1,65 | Cyclopentanone | 98 | 84.116 | C₅H₈O |
| 2 | 3.654 | 0,25 | 2-methylcyclopentanone | 89 | 98.143 | C ₆ H ₁₀ O |
| 3 | 4.032 | 0,20 | 3-methyl-2-ethyl-1-butene | 86 | 98.186 | C ₇ H ₁₄ |
| 4 | 4.843 | 0,49 | 2-(Methoxymethyl)furan | 95 | 112.127 | C ₆ H ₈ O ₂ |
| 5 | 4.947 | 0,39 | 2,5-Dimethoxytetrahydrofuran | 96 | 132.158 | C ₆ H ₁₂ O ₃ |
| 6 | 6.161 | 0,41 | N-Nitrosodimethylamine | 94 | 74.082 | C ₂ H ₆ N ₂ O |
| 7 | 7.091 | 0,19 | 6-Methyl-bicyclo[4.2.0]octan-7-ol | 85 | 140.223 | C ₉ H ₁₆ O |
| 8 | 7.516 | 0,30 | 2,3-Dimethyl-2-cyclopenten-1-one | 89 | 110.154 | C ₇ H ₁₀ O |
| 9 | 7.618 | 0,28 | 1-methoxy-2-Butanol | 91 | 104.148 | C ₅ H ₁₂ O ₂ |
| 10 | 7.778 | 2,71 | 2-Cyclopenten-1-one | 97 | 82.101 | C₅H₆O |
| 11 | 8.104 | 0,38 | 3,5-dimethyl-Cyclohexanol | 85 | 128.212 | C ₈ H ₁₆ O |
| 12 | 8.368 | 2,91 | 2-methylcyclopentenone | 96 | 96.127 | C₆H₈O |
| 13 | 8.725 | 1,86 | 1-Hydroxy-2-butanone | 98 | 88.105 | C₄H₈O₂ |
| 15 | 11.405 | 0,30 | 3-Furaldehyde | 93 | 96.084 | C ₅ H ₄ O ₂ |
| 16 | 11.617 | 1,09 | 2-Ethylcyclohexyl butyrate | 85 | 198.302 | C₁₂H₂₂O₂ |
| 17 | 12.747 | 15,75 | Furfural | 99 | 96.084 | C₅H₄O₂ |
| 19 | 13.796 | 0,26 | 2,3,4-Trimethyl-2-cyclopenten-1-one | 91 | 124.180 | C ₈ H ₁₂ O |
| 20 | 14.167 | 1,24 | 1-Methyl-1-cyclopenten-3-one | 95 | 96.127 | C₆H₈O |
| 21 | 14.445 | 3,14 | 2-Acetylfuran | 98 | 110.111 | C₆H₆O₂ |
| 22 | 14.714 | 1,36 | Tetrahydro-2-Furanmethanol (THFA) | 93 | 102.132 | C₅H₁₀O₂ |
| 27 | 16.528 | 0,30 | 2,3-Pentanedione | 88 | 100.116 | C ₅ H ₈ O ₂ |
| 28 | 16.693 | 0,27 | 2-Oxobutyl acetate | 93 | 130.142 | C ₆ H ₁₀ O ₃ |
| 31 | 17.667 | 4,23 | 5-Methyl-2-furaldehyde | 97 | 110.111 | C₆H₆O₂ |
| 33 | 18.316 | 1,60 | Methyl-2-furoate | 98 | 126.110 | C₆H₆O₃ |
| 34 | 19.218 | 0,39 | Butyrolactone | 95 | 86.089 | C ₄ H ₆ O ₂ |
| 36 | 19.389 | 0,31 | 2-Methyl-2,3-divinyloxirane | 86 | 110.154 | C ₇ H ₁₀ O |
| 37 | 19.617 | 0,30 | 2-Acetyl-5-methylfuran | 91 | 124.137 | C ₇ H ₈ O ₂ |
| 38 | 19.926 | 0,23 | Methyl benzoate | 90 | 136.148 | C ₈ H ₈ O ₂ |
| 39 | 20.796 | 0,64 | 3,5-Dimethyl-2(5H)-furanone | 96 | 112.127 | C ₆ H ₈ O ₂ |
| 42 | 22.707 | 0,39 | 3-Ethyl-2-hydroxy-2-cyclopenten-1-one | 92 | 126.153 | C ₇ H ₁₀ O ₂ |
| 48 | 26.184 | 0,21 | Veratrol | 89 | 138.164 | C ₈ H ₁₀ O ₂ |
| 50 | 29.180 | 0,51 | 2,4-Dimethyl-1,3-cyclopentanedione | 87 | 126.153 | C ₇ H ₁₀ O ₂ |
| 52 | 30.430 | 2,26 | 3-Methyl-1,2-cyclopentanedione | 91 | 112.127 | C₆H₈O₂ |
| 53 | 32.161 | 16,40 | Guaiacol | 98 | 124.137 | C₇H₈O₂ |
| 54 | 32.898 | 0,93 | 3-methylguaiacol | 93 | 138.164 | C₈H₁₀O₂ |
| 55 | 33.795 | 0,59 | 3-Ethyl-2-hydroxy-2-cyclopenten-1-one | 95 | 126.153 | C ₇ H ₁₀ O ₂ |
| 56 | 34.748 | 2,30 | Furan-2-carbaldehyde, (N'-nitroamidino)hydrazone | 85 | 197.152 | C₆H₇N₅O₃ |

| | | | | | | |
|----|--------|------|--------------------------------|----|---------|--|
| 57 | 35.027 | 0,19 | 2,6-Xylenol | 95 | 122.164 | C ₈ H ₁₀ O |
| 58 | 36.107 | 0,63 | 6-Methoxy-m-cresol | 92 | 138.164 | C ₈ H ₁₀ O ₂ |
| 59 | 36.477 | 0,27 | Maltol | 97 | 126.110 | C ₆ H ₆ O ₃ |
| 60 | 36.830 | 4,89 | p-Creosol | 97 | 138.164 | C ₈ H ₁₀ O ₂ |
| 61 | 37.264 | 0,53 | N-Amylpyrrole | 85 | 137.222 | C ₉ H ₁₅ N |
| 62 | 39.301 | 1,44 | Phenol | 97 | 94.111 | C ₆ H ₆ O |
| 63 | 39.651 | 1,22 | o-cresol | 97 | 108.138 | C ₇ H ₈ O |
| 64 | 40.434 | 2,63 | 4-Ethylguaiacol | 94 | 152.190 | C ₉ H ₁₂ O ₂ |
| 66 | 42.931 | 0,67 | p-Cresol | 97 | 108.138 | C ₇ H ₈ O |
| 67 | 43.072 | 0,31 | 3,5-Xylenol | 94 | 122.164 | C ₈ H ₁₀ O |
| 68 | 43.250 | 0,49 | m-Cresol | 96 | 108.138 | C ₇ H ₈ O |
| 69 | 43.267 | 0,58 | 2,3-Xylenol | 87 | 122.164 | C ₈ H ₁₀ O |
| 70 | 43.480 | 0,17 | 3,4-Dimethoxyphenol | 90 | 154.163 | C ₈ H ₁₀ O ₃ |
| 71 | 44.121 | 0,37 | 4-propylguaiacol | 91 | 166.217 | C ₁₀ H ₁₄ O ₂ |
| 72 | 46.098 | 0,14 | 2,4-Xylenol | 85 | 122.164 | C ₈ H ₁₀ O |
| 73 | 46.574 | 0,15 | 3-Allyl-6-methoxyphenol | 95 | 164.201 | C ₁₀ H ₁₂ O ₂ |
| 74 | 49.749 | 0,21 | 4,5-dimethylimidazole | 98 | 96.130 | C ₅ H ₈ N ₂ |
| 75 | 50.770 | 8,52 | 2,6-dimethoxyphenol (Syringol) | 97 | 154.163 | C ₈ H ₁₀ O ₃ |
| 76 | 54.427 | 2,54 | 4-methylsyringol | 86 | 168.189 | C ₉ H ₁₂ O ₃ |
| 77 | 56.953 | 1,65 | 5-tert-Butylpyrogallol | 85 | 182.216 | C ₁₀ H ₁₄ O ₃ |
| 78 | 62.141 | 0,11 | 4-allyl-syringol | 86 | 194.227 | C ₁₁ H ₁₄ O ₃ |

Discussion

It is important to highlight the importance of purification of PA by vacuum distillation, because during this process all traces of heavy oils and tar are removed. For several uses, mainly as an animal feed additive, crude PA must be purified for yielding a food grade product, which is free of both toxic and carcinogenic compounds (Higashino et al., 2005; Sakaguchi et al., 2007). Toxic and carcinogenic compounds are, respectively, the phenolic fraction and the polycyclic aromatic hydrocarbons that are both intrinsically associated to wood tar and pitch (Pimenta et al., 2000). This way, it seems there is no practical sense in using crude PA when the goal is to evaluate its antibacterial and antifungal activity, as both toxic and carcinogenic compounds can conceal the results.

Evaluation of Antibacterial and Antifungal Activity

In Table 4, the results of inhibition halos in different concentrations of both types of PA are showed. For all microorganisms, the diameter of inhibition halos in distilled water was zero. In a first simpler approach and observing a generic trend, when the PAs were tested in a concentration of 100%, the average inhibition halos were, in most cases, larger than those obtained with gentamicin. Both *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* showed no inhibition in their growth under the effect of gentamicin. Mostly, for both PAs, the halos obtained at the concentration of 20% had diameters lower than 10 mm. Under 20% of concentration, there was no inhibition. In the work of Pereira et al. (2007), which evaluated the effect of crude PA on several species of *Candida* and *Pseudomonas*, inhibitions of growth at dilutions up to 1% were successfully achieved; however, in the present work, dilutions higher than 20% did not inhibit the growth of neither *Candida albicans* nor *Pseudomonas aeruginosa*. On the other hand, some authors, as Ibrahim et al. (2012), have worked with concentrated PA's. Further studies can evaluate if the concentration process is indispensable to achieve results of inhibition or if the product can be used pure or diluted as done here.

Table 4: Diameter of inhibition halos for *Mimosa tenuiflora* and *Eucalyptus urograndis* PA's on microorganism growth

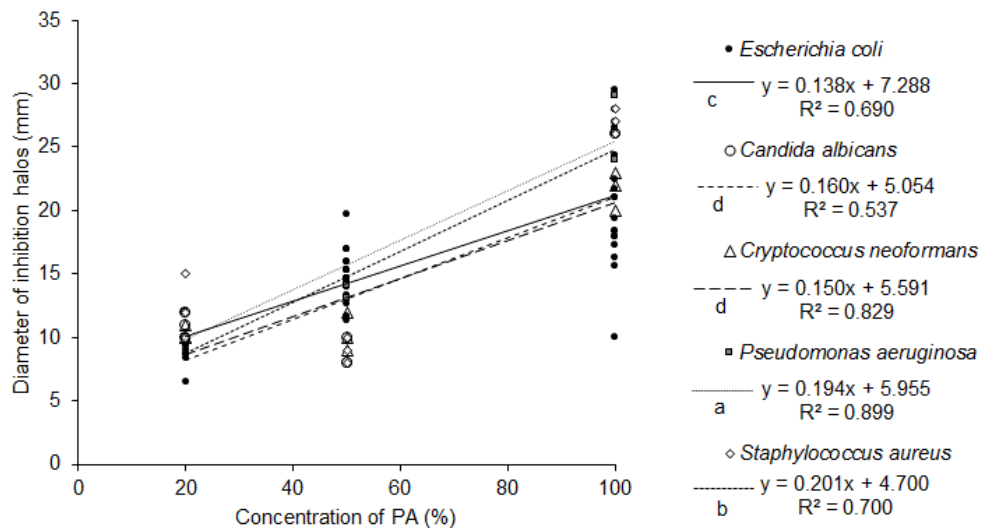
|]Microorganism | Diameter of inhibition halos (mm) | | | | | | |
|---------------------|-----------------------------------|------|------|------------------------------|------|------|------------|
| | <i>Mimosa tenuiflora</i> | | | <i>Eucalyptus urograndis</i> | | | Gentamicin |
| | PA conc. (%) | | | PA conc. (%) | | | |
| | 100 | 50 | 20 | 100 | 50 | 20 | |
| <i>E. coli</i> 0001 | 26.3 | 11.3 | 8.7 | 26.5 | 19.7 | 3.0 | 24.3 |
| <i>E. coli</i> 0002 | 17.0 | 16.0 | 11.3 | 18.3 | 16.0 | 10.0 | 10.3 |
| <i>E. coli</i> 0004 | 17.0 | 19.0 | 7.0 | 18.3 | 17.0 | 4.3 | 14.6 |
| <i>E. coli</i> 0006 | 25.3 | 14.7 | 11.7 | 22.5 | 14.7 | 9.3 | 25.3 |
| <i>E. coli</i> 0008 | 26.0 | 11.7 | 11.0 | 28.0 | 15.3 | 8.7 | 12.7 |
| <i>E. coli</i> 0014 | 17.0 | 17.0 | 13.3 | 19.3 | 15.3 | 10.7 | 12.0 |
| <i>E. coli</i> 0015 | 17.3 | 17.0 | 11.7 | 10.0 | 15.3 | 10.0 | 12.0 |

| | | | | | | | |
|---------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| <i>E. coli</i> 0017 | 16.3 | 15.7 | 11.3 | 18.0 | 14.7 | 10.0 | 10.3 |
| <i>E. coli</i> 0018 | 20.3 | 15.0 | 12.0 | 16.3 | 14.3 | 8.7 | 15.0 |
| <i>E. coli</i> 0025 | 29.5 | 15.0 | 11.3 | 27.0 | 14.7 | 11.0 | 11.6 |
| <i>E. coli</i> 0028 | 22.0 | 15.0 | 11.3 | 21.7 | 14.0 | 12.0 | 14.0 |
| <i>E. coli</i> 0031 | 17.0 | 14.3 | 10.0 | 18.0 | 11.7 | 8.3 | 12.0 |
| <i>E. coli</i> 0033 | 15.0 | 15.0 | 10.3 | 15.7 | 17.0 | 10.0 | 12.3 |
| <i>E. coli</i> 0194 | 25.0 | 15.3 | 10.3 | 24.3 | 14.7 | 9.7 | 12.0 |
| <i>E. coli</i> 1229 | 21.7 | 14.0 | 11.0 | 21.0 | 13.3 | 9.3 | 10.3 |
| <i>E. coli</i> 1563 | 33.0 | 15.0 | 10.3 | 29.5 | 14.7 | 10.0 | 15.3 |
| <i>E. coli</i> 1641 | 24.0 | 14.3 | 10.0 | 21.0 | 11.3 | 9.7 | 14.0 |
| <i>E. coli</i> 1681 | 15.7 | 16.3 | 10.3 | 17.3 | 16.0 | 10.0 | 17.3 |
| <i>E. coli</i> 1926 | 24.7 | 14.3 | 10.0 | 24.3 | 12.7 | 10.7 | 24.3 |
| <i>Escherichia coli</i> (\bar{X}) | 21.2 | 15.1 | 10.7 | 20.2 | 14.9 | 9.7 | 14.7 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 24.3 | 15.7 | 11.0 | 26.3 | 13.3 | 11.3 | 0,0 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 18.3 | 9.7 | 13.0 | 27.0 | 9.0 | 12.3 | 0,0 |
| <i>Candida albicans</i> | 25.0 | 8.3 | 10.3 | 26.0 | 8.7 | 11.0 | - |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | 20.7 | 9.7 | 11.0 | 21.7 | 10.3 | 10.3 | - |

In the control with distilled water, for all microorganisms, diameter of inhibition halos = 0 mm

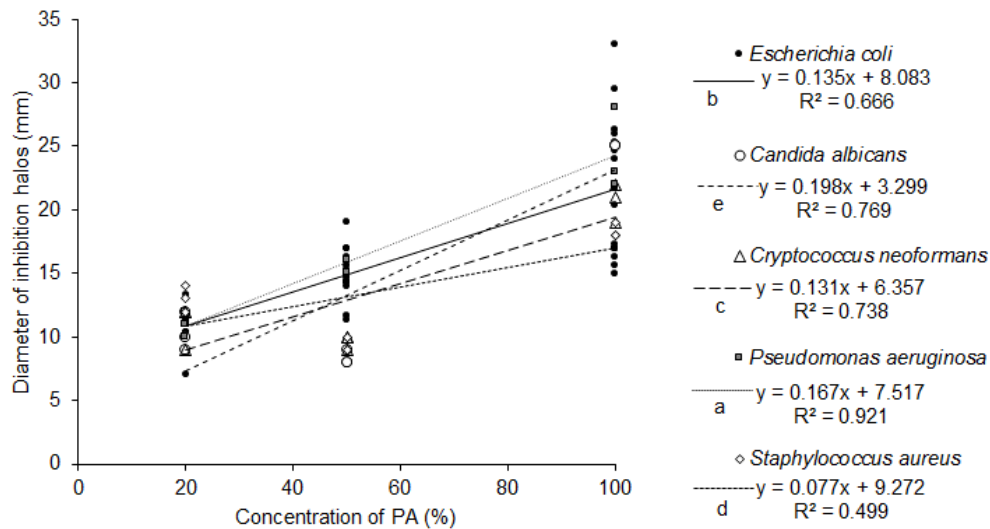
Graphs obtained from the adjusted models are showed in Figures 3 and 4. The graphs make explicit the effect of concentration of PA on growth of microorganisms. In this analysis, the antimicrobial effect on microorganisms was compared within the same type of PA. For the two types of PA, all adjusted equations were statistically significant, and growth inhibition data presented a linear behavior, since the β_1 parameters of all equations were significant at 5% of significance, indicating an increase in diameter of inhibition halos with the increase in PA concentration. Equations followed by different or same letter between parenthesis [(a), (b), (c), (d) or (e)] indicate that the effect of one EP is statistically different or equal on microorganism growth. Obviously, since the microorganisms are from different species, it is natural that they respond differently to the action of PAs, except for *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*, which

responded similarly to the effect of *Eucalyptus urograndis* PA. This fact is clear because the equations adjusted for both yeasts are statistically equal, what means that, for the same concentrations of such PA, the diameter of inhibition halos will be statistically the same. In this case, the identity test of models was a useful tool, as they allowed to know when different microorganisms were affected in the same way by an external agent, what is in conformity to conclusions detailed by Regazzi (1993, 1996).



Equations are statistically different at 5% of significance by the identity test of models, except when followed by equal

Figure 3: Effect of concentration of *Mimosa tenuiflora* PA on growth of microorganisms.



Equations are statistically different at 5% of significance by the identity test of models

Figure 4: Effect of concentration of *Eucalyptus urograndis* PA on growth of microorganisms

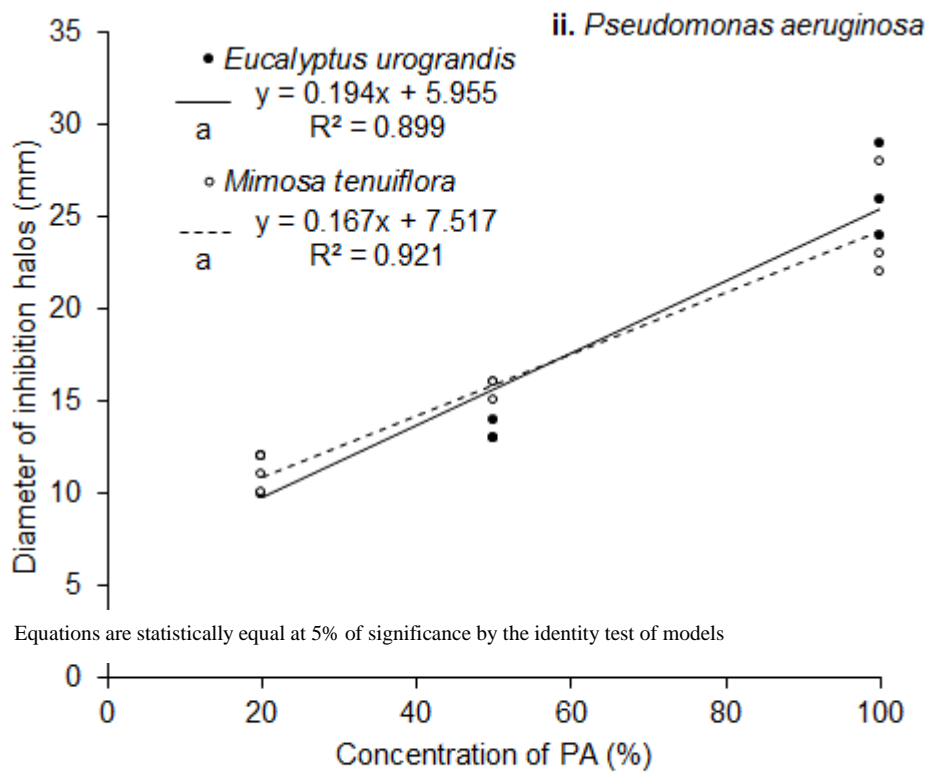
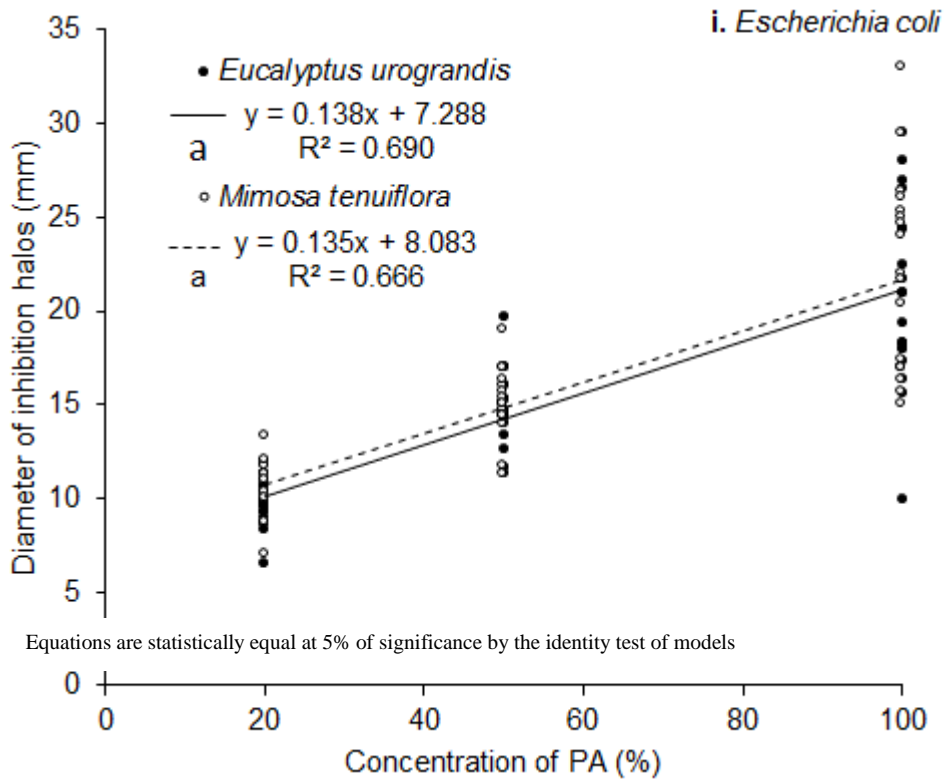
Despite the fact of chemical composition of both PA's is not exactly the same, regarding to major components it is rather similar. Among phenols, the major compounds is guaiacol (2-methoxy-phenol) with the concentrations of 16.31 and 26.98 on *Eucalyptus* and *Mimosa* PA's, respectively. The higher content of guaiacol in the *Mimosa* PA is probably related with the higher content of lignin in the original wood. Other noticeable difference is the complete absence of syringol (2,6-dimethoxy-phenol) and its derivatives in the *Mimosa* PA. Regarding to the presence of syringol the composition of *Eucalyptus* PA is similar to the composition of the PA obtained from *Litchi sinensis*. Also the PA from this species is reported as having antibacterial properties (Yang et al., 2016)

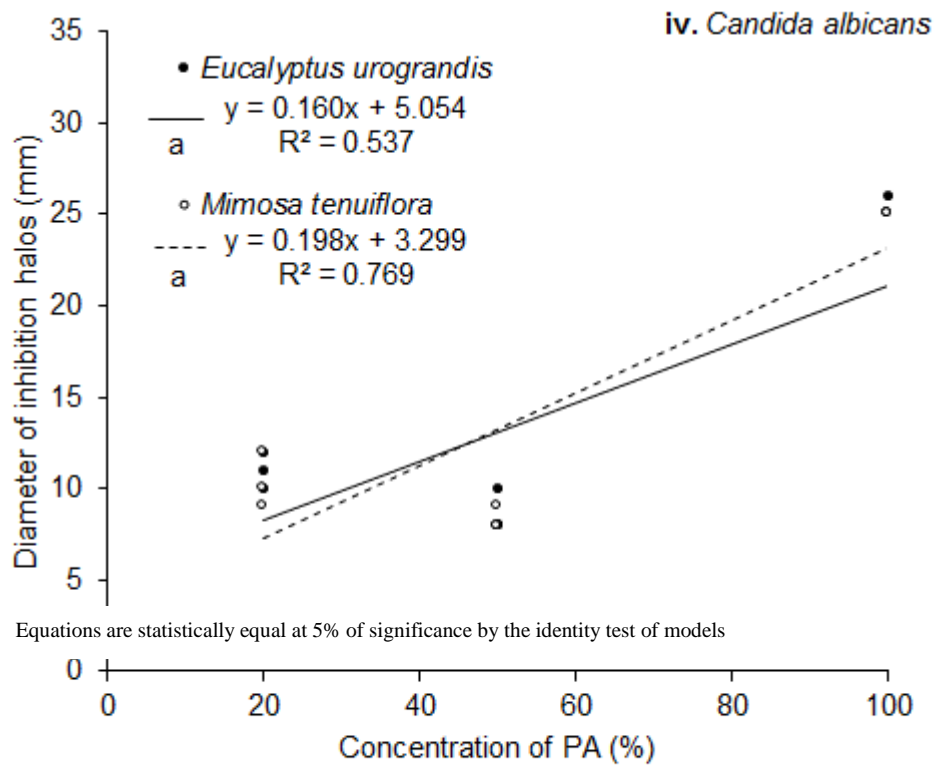
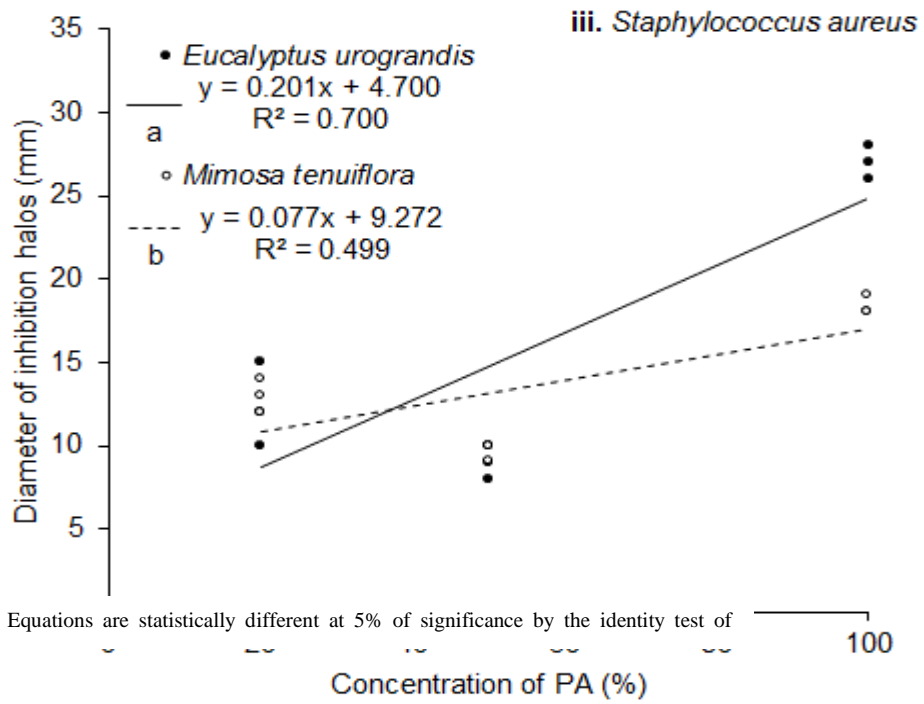
The presence of high contents of guaiacol and its derivatives along with other phenols and furfural can explain the antibacterial and antifungal activity of both PA's. Guaiacol is used medicinally as an expectorant, antiseptic, and local anesthetic (Human Metabolome Database). Phenol is of some therapeutic value as a fungicide (Merck Index, 2013). The cresols (*o*, *m* and *p*-cresol or 2, 3 and 4-methy-phenol) are used as local antiseptic, parasiticide, disinfectant and as intestinal antiseptic (Merck Index, 2013). Furfural (2-furaldehyde) is found in allspice. It is a flavor ingredient and can act as fungicide (EPA Office of Pesticide Programs - URL:

<http://www.ipmcenters.org/ECotox/index.cfm> and Abdel-Khar et al., 2015). Furfural also has nematicide activity (Ismail and Mohamed, 2007, Crow and Luc, 2014).

Other major compounds as cyclopentanone, for example, and some phenols present in the PA's are only flavoring agents, e.g., xylenol, syringol and their derivatives. The compound 4-ethyl-guaiacol, for example, is a flavoring agent. Minor compounds include derivatives of the compounds listed here above, substituted with methyl, ethyl or propyl groups but none of them are referred as having some antibacterial or antifungal effect. Veratrol, an antiseptic agent derivative from guaiacol, is present in the composition of both PA's but as a minor compound as well. Probably, the antibacterial and antifungal properties of wood vinegar from different sources can not be attributed to a single compound but to a combination of several ones as pointed out by Yang et al. (2016).

Figure 5 (numbered from *i* to *v*, in roman numerals) shows a second statistical approach whereby the effect of both types of PAs is evaluated at the same time in a same microorganism. The results are showed in the graphs plotted from adjusted equations. Here as well, equations followed by same letter are statistically equal by the identity test of models, which means that, whatever the EP used, the effect of inhibiting the microorganism growth will be the same. The models are statistically the same for all microorganisms, except for *Staphylococcus aureus*, on which the EP effect was different, with an apparently more pronounced inhibitory effect for *Eucalyptus urograndis* PA. In brief, with the exception of *Staphylococcus aureus*, for all the other microorganisms, no matter which PA is applied, the inhibitory effect is the same. The composition of PAs is usually different, since it depends on the type of lignin that is present in the woody structure of the plants (Yoshimoto, 1994), but their effects are quite similar for usage in agriculture, veterinary and forestry. Such characteristic is important because PA can thus be produced with any available type of lignocellulosic raw material, even agricultural wastes. Most of the research papers cited throughout the present article refer to the use of PAs from many different types of woods. Even small farmers can benefit from this universality of raw materials to produce their own PA for local use, what is reality in many countries (Campos 2007, Tiilikkala et al., 2010). However, methods of purification must be standardized and spread, in order to obtain PAs with an acceptable quality.





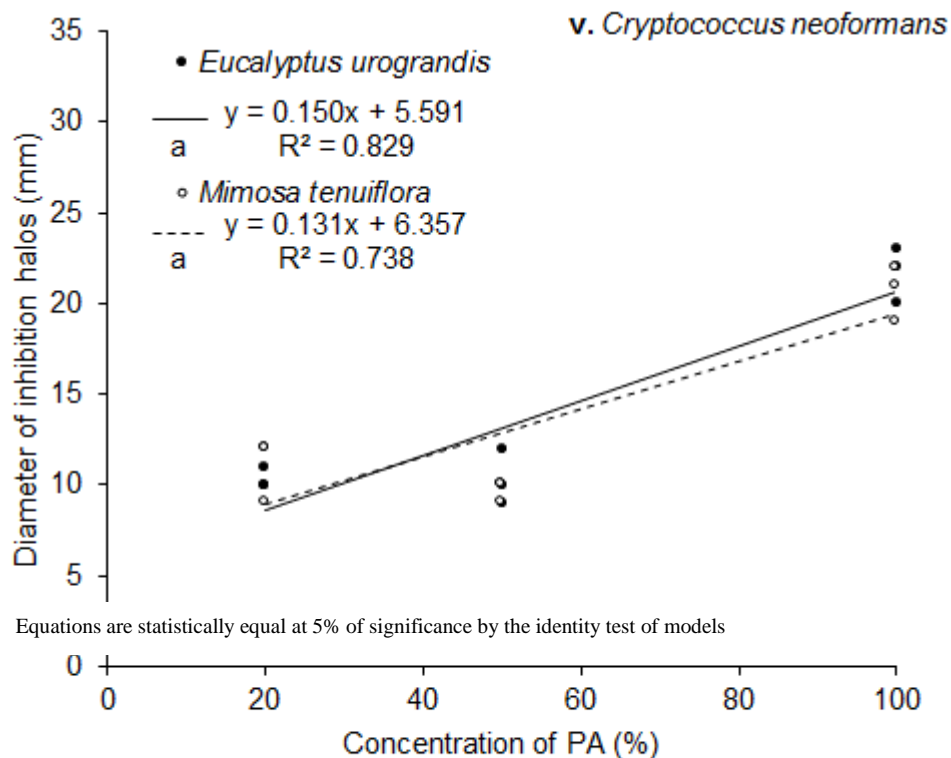


Figure 5: Effect of concentration of PAs on growth of microorganisms

As a conclusion of the present work, the feasibility the usage of PAs produced with wood species planted in large scale in Brazil was evident. Another aspect is their real potential as a basis to produce natural antibacterial and antifungal agents, with real possibility to be used in veterinary applications. However, it is important to emphasize that the evaluations carried out here were done *in vitro*; therefore, other works should be conducted with different pathogenic microorganisms in order to define minimum inhibition concentrations. In addition, PAs should be also tested *in vivo* if possible, in mammals and birds infected with pathogenic bacteria and fungi, for assessing the actual practical potential of PA as a substitute for commonly used antibacterial and antifungal agents. The identity test of linear quadratic models could be used satisfactorily and reveal itself as an applicable tool to assess the effect of PA's on bacteria and yeasts.

Acknowledgements

K.M.G. Lima acknowledges the CNPq Grant (305962/2014-0) for the financial support.

Conflict of Interest

The authors declare that no conflict of interest exists.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho nos deu a oportunidade de demonstrar através de dados científicos algumas das utilidades práticas do extrato pirolenhoso, comprovando sua eficácia em combater fungos e bactérias nocivas à saúde animal e humana, que nas últimas décadas vem se tornando cada vez mais difícil, já que as bactérias e fungos tem adquirido resistência aos medicamentos existentes atualmente, dessa forma este trabalho se propôs a preencher está lacuna e dar um destino ao sub produto da crescente indústria madeireira, através do aproveitamento da fumaça, produzida pela indústria da madeira, utilizando as espécies mais cultivadas e difundidas no país.

Podemos assim demonstrar a sua eficácia e propor uma padronização da técnica de obtenção do extrato pirolenhoso, eliminando assim os riscos de toxicidade do alcatrão, para a produção de um extrato que possa ser utilizado de forma segura, estimulando assim novas pesquisas para que possamos fazer uso do extrato e estimular as pesquisas em vivo, para obtermos produtos naturais que possam fazer frente as bactérias e fungos resistentes que temos atualmente.

References

- Abdel-Kahr, M.M., Hamman, M.M.A., El-Mougy, N.S., Abd-Elgawad, M.M.M. (2015) Pesticide alternatives for controlling root and root knot of cucumber under plastic house conditions. *International Journal of Engineering and Innovative Technology*, **4**, 11, 25-31.
- Azevedo, M.M., Ramos, I.F., Cruz, L.C., Vaz, C.P. and Rodrigues, A.P. (2015) Genesis of azole antifungal resistance from agriculture to clinical settings. *J. Agric. Food Chem.*, **63**, 34, 7463-7468.
- Busoli, A.C., Bissoli, G. and Pereira, F.G. (2004) Seletividade do extrato pirolenhoso (BIOPIROL) sobre larvas de joaninha *Hippodamiaconvergens* (Coleoptera: Coccinellidae) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP – Jaboticabal, São Paulo, Brazil.
- Campos, A. D. (2007). Técnicas para produção de extrato pirolenhoso para uso agrícola. Pelotas-RS, Brazil, EMBRAPA (Empresa Brasileira de Agropecuária).
- Chan, E.W.C., Chin, H.F., Kor, X.K. and Chong, H.H. (2012) Potent antibacterial activity of wood vinegar from Matang Mangroves, Malaysia. *ISME/GLOMIS Electronic Journal, International Society for Mangrove Ecosystems (ISME)*, **10**, 4, 10-12.
- Choi, J.Y., Shinde, P.L., Kwon, I.K, Song, Y.H. and Chae, B.J. (2009) Effect of wood vinegar on the performance, nutrient digestibility and intestinal microflora in weanling pigs. *Asian-Aust J. Anim. Sci.*, **22**, 2, 267-274.
- Crow, W.T.; Luc, J.E. (2014). Field efficacy of furfural as a nematicide on turf. *Journal of Nematology*, **46**, 1, 8-11.
- Doran, W.L. (1932) Acetic acid and pyroligneous extract in comparison with formaldehyde as soil disinfectants. *Journal of Agriculture Research*, **44**, 7, 571-578.
- Gujarati D. N. and Porter, D.C. *Basic Econometrics*. 5. ed. Boston: McGraw-Hill, 2009. 922 p.

Higashino, T., Shibata, A., Yatagai, M. (2005) Basic study for establishing specifications for wood vinegar by distillation I. Study of regulations and reproducibility of compounds contained in distilled wood vinegar. *Journal of the Japan Wood Research Society*, **51**, 3, 180-188.

Ibrahim, D., Kassim, J., Sheh-Hong, L. and Rusli, W. (2013) Efficacy of pyroligneous acid from *Rhizophora apiculata* on pathogenic *Candida albicans*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **3**, 07, 007-013.

Ismail, A.E.; Mohamed, M.M. (2007). Effect of different concentrations of furfural as botanical nematicide and the application methods in controlling *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis* infecting. *Pak. J. Nematol.*, **25**, 1, 45-52.

Kang, M.Y., Heo, K.H., Kim, J.H., Cho, S.S., Seo, P.D. and Rico C.M. (2012) Effects of carbonized rice hull and wood charcoal mixed with pyroligneous acid on the yield, and antioxidant and nutritional quality of rice. *Turk J. Agric. For.*, **36**, 45-53.

Kim, D.U., Seo, H.E., Lee, S. and Lee, K. (2008) Effects of wood vinegar mixed with insecticides on the mortalities of *Nilaparvatalugens* and *Laodeophax striatellus* (Homoptera: Delphacidae). *Animal Cells and Systems*, **12**, 47-52.

Kook, K. and Kim, K.H. (2002) Effect of supplemental bamboo vinegar on production and meat quality of meat-type ducks. *Korean J. Anim. Sci. Technol.*, **29**, 293-300.

Kook, K., Kim, J.E., Jung, K.H., Kim, J.P., Koh, H.B., Lee, J.I., Kim, C.R. and Kim, K.H. (2003) The effects of supplemental levels of bamboo vinegar on growth performance, serum profile and meat quality in fattening Hanwoo cow. *Korean J. Anim. Sci. Technol.*, **45**, 57-68.

Li, H.L. and Ryu, K.S. (2001) Effect of feeding various vinegar on performance and egg quality of laying hens. *Korean J. Anim. Sci. Technol.*, **43**, 655-662.

Melo, R.M., Silva, R.M., Barros, R.O.M., Mazorche, R.M., Queiroz, V.T. and Póvoa, H.C.C. (2007) Estudo da atividade antimicrobiana do licor pirolenhoso em bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Serratia*. *Revista Científica da FAMINAS*, **3**, 1, 47.

Nachman, K. (2016) Pills for pigs: just say no. *Scientific American*, **314**, 3, 11.

Nakai, T., Kartal, N., Hata, T. and Imamura, Y. (2007) Chemical characterization of pyrolysis liquids of wood-based composites and evaluation of their bio-efficiency. *Building and Environment*, **42**, 1236-1241.

O'neil, M.J. The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 2013.

Oliveira, E., Vital, B.R., Pimenta, A.S., Lucia, R.M.D., Ladeira, A.M.M. and Carneiro, A. C. O. (2006) Anatomical structure and charcoal quality of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. wood. *Revista Árvore*, **30**, 2, 311-318.

Payamara, J. (2011) Usage of wood vinegar as new organic substance. *Int. J. of ChemTech Research*, **3**, 3, 1658-1662.

Pereira, B.L.C., Carneiro, A.C.O., Carvalho, A.M.M.L., Trugilho, P.F., Melo I.C.N.A. and Oliveira, A.C. (2013) Study of thermal degradation of Eucalyptus wood by thermogravimetry and calorimetry. *Revista Árvore*, **37**, 3, 567-576.

Pereira, C., Salvato, N.A., Lopes, N.S., Campos, S.P., Queiroz, V.T. and Póvoa, H.C.C. (2007) Efeito do licor pirolenhoso sobre diferentes espécies do gênero *Candida*. *Revista Científica da FAMINAS*, **3**, 1, 39.

Pimenta, A.S., Bayona, J.M., García, M.T. and Solanas, A.M. (2000) Evaluation of acute toxicity and genotoxicity of liquid products from *Eucalyptus grandis* wood pyrolysis. *Archives of Environ. Cont. and Toxicology*, **38**, 169-175.

Rakmai, J. (2009) *Chemical determination, antimicrobial and antioxidant activities of Thai wood vinegars*. M.Sc. thesis, Prince of Songkhla University, Songkhla, Thailand, 2009.

Regazzi, A. J. (1993) Test to verify the identity of regression models and equality of some parameters in polynomial orthogonal models. *Revista Ceres*, **40**, 228, 176-195.

Regazzi, A.J. (1996) Identity tests for regression models. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **31**, 1, 1-17.

Santos, R.C., Carneiro, A.C.O., Pimenta, A.P., Castro, R.V., Marinho, I.V., Trugilho, P.F., Alves, I.C.N. and Castro, A.F.N.M. (2013) Energy potential of species from

forest management plan for the Rio Grande do Norte State. *Ciência Florestal*, **23**, 02, 493-504.

Silva, R.M., Melo, R.M., Mazorche, R.M., Barros, R.O.M., Queiroz, V.T. and Póvoa, H.C.C. (2007) Estudo da atividade antimicrobiana do licor pirolenhoso sobre bactérias dos gêneros *E. coli* e *Klebsiella*. *Revista Científica da FAMINAS*, 3, 1, 46.

Souza, J.B.G., Ré-poppi, N. and Raposo Jr., J.L. (2012) Characterization of pyrolygneous acid used in agriculture by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Brazilian Chemical Society*, **4**, 610-617.

Steiner, C. (2008) Charcoal and smoke extract stimulate the soil microbial community in a highly weathered xanthic Ferralsol. *Pedobiologia*, **51**, 359-366.
The human metabolome database (<http://www.hmdb.ca/>)

Thuler, R.T., Bortoli, S.A. and Barbosa, J.C. (2007) Effectiveness of chemical insecticides and plant products for the control of *Plutella xylostella*. *Científica*, **35**, 2, 166-174.

Tiilikkala, K., Fagernäs, L. and Tiilikkala, J. (2010) History and use of wood pyrolysis liquids as biocide and plant protection product. *The Open Agricultural Journal*, **4**, 111-118.

Togoro, A.H., Silva, J.A.S. and Cazetta, J.O. (2014) Chemical changes in oxisol treated with pyrolygneous acid. *Ciência e Agrotecnologia, Lavras*, 38, 2, 113-121.

Vandeputte, P., Ferrari, S. and Coste, A.T. (2012) Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *Int. J. Microbiol.*, 2012:713687.

Watarai, S. and Koiwa, M. (2008) Feeding activated charcoal from bark containing wood vinegar liquid (Nekka-Rich) is effective as treatment for Cryptosporidiosis in calves. *J. Dairy Sci.*, **91**, 1458-63.

Yang, J., Yang, C., Liang, M., Gao, Z.; Wu, Y.; Ghuang, L. (2016) Chemical composition, antioxidante, and antibacterial activity of wood vinegar from Litchi sinensis. *Molecules*, **21**, 1150, 1-10.

Yantorno, J.A. La indústria de la destilación de leña y sus derivados. Librería El Ateneo, Buenos Aires, Argentina, 1933.

Yin, L.A. (2008) *Isolation and characterization of antioxidant compounds from pyroligneous acid of Rhizophora apiculata*. Universiti Sains Malaysia, Penang, Malaysia, Ph.D. Thesis, 46 p.

Yoshimoto, T. (1994) Present status of wood vinegar studies in Japan for agricultural usage. In *Proceedings of the 7th International Congress of the Society for the Advancement of Breeding Researches in Asia and Oceania (SABRAO)*, Taichung, Taiwan, p. 811-820.

Zulkarami, B., Ashrafuzzman, M., Husni, M.O and Mohamed, R.I.(2011) Effect of pyroligneous acid on growth, yield and quality improvement of rockmellon in soilless culture. *Australian Journal of Crop Science*, **5**, 12, 1508-1514.