

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FLORESTAIS E DA MADEIRA

GABRIEL ZUQUI PASSAMANI

A TEMPERATURA DE PIRÓLISE INFLUENCIA NA COMPOSIÇÃO
QUÍMICA DO LÍQUIDO PIROLENHOSO E NO SEU POTENCIAL
ANTIMICROBIANO?

JERÔNIMO MONTEIRO
ESPÍRITO SANTO

2021

GABRIEL ZUQUI PASSAMANI

Monografia apresentada ao Departamento de Ciências Florestais e da Madeira da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Engenheiro Industrial Madeireiro.

JERÔNIMO MONTEIRO

ESPÍRITO SANTO

2021

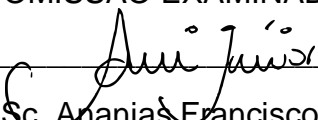
GABRIEL ZUQUI PASSAMANI

A TEMPERATURA DE PIRÓLISE INFLUENCIA NA COMPOSIÇÃO
QUÍMICA DO LÍQUIDO PIROLENHOSO E NO SEU POTENCIAL
ANTIMICROBIANO?

Monografia apresentada ao Departamento de Ciências Florestais e da Madeira da
Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título
de Engenheiro Industrial Madeireiro.

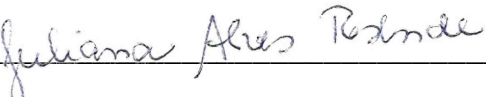
Aprovada em...21... de dezembro de2021.....

COMISSÃO EXAMINADORA



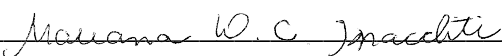
Profº. DSc. Ananias Francisco Dias Júnior
Universidade Federal do Espírito Santo

Orientador



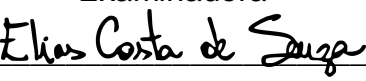
Profº. DSc. Juliana Alves Resende
Universidade Federal do Espírito Santo

Conselheira



Profº. DSc. Mariana Drummond Costa Ignacchiti
Universidade Federal do Espírito Santo

Examinadora



Profº. MSc. Elias Costa de Souza
Universidade de São Paulo

Examinador

AGRADECIMENTOS

Neste momento de grande importância dedico e agradeço a muitas figuras importantes na minha vida.

Mesmo não vendo, creio e agradeço a Ele: luz vinda do céu que sempre me guiou, protegeu e me amou antes mesmo do meu nascimento. Deus do amor, onde não julga e discrimina, cuida dos pecadores, pobres e humildes.

À minha querida mãe Amélia (*in memoriam*), mesmo que não esteja mais presente em corpo físico, mas está sempre ao meu lado onde seu manto de proteção e amor me cobrem até hoje. A minha avó Maria, por me mostrar o que significa amor incondicional, puro e genuíno. Ela é meu anjo da guarda e razão pela qual tenho forças para realizar os meus objetivos. Aos meus padrinhos de batismo Ana e Maurício, que são os melhores conselheiros e amigos que tenho na família e sempre estão em contato comigo para saber se estou bem. Ao meu pai Vanderlei, por me amar tanto e sempre cuidar de mim até mesmo quando acho que não preciso.

Aos meus amados professores da graduação Ananias, Michel e Ana Boa que cumpriram um papel fundamental na minha vida, onde me guiaram não só na minha vida acadêmica, mas também na vida pessoal. Acredito que vocês possuem a verdadeira essência da profissão que é educar e transferir o conhecimento genuinamente para seus alunos, onde foram referência para me tornar um profissional ético e capaz de prover mudanças. A vocês, o meu máximo respeito e admiração.

Agradeço a Universidade Federal do Espírito Santo - UFES pela bolsa remunerada concedida a esse projeto. Ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais – CNPEM por abrir as portas e colaborar com esse estudo. Ao Prof^o Demetrius Profeti do Departamento de Química e Física da UFES por toda ajuda e orientações nas análises realizadas. Aos companheiros do grupo de pesquisa do Laboratório de Energia da Biomassa – LEB UFES pela ajuda, companhia e pelo crescimento profissional que tivemos juntos. Agradeço também ao Grupo Aplicado em Microbiologia do Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde da UFES pela parceria feita, onde foram muito solícitos e indispensáveis para a realização deste trabalho.

Por fim, termino essa dedicatória aos incontáveis amigos que fiz durante esses anos de graduação, em especial, aos que acompanharam toda minha trajetória em Alegre: Flávia, Fernanda, Mileidy, Kássia, Janaína, Ana Paula, Hudson, Matheus e Sanderson (*in memoriam*). Também agradeço a todos meus amigos de Guarapari, pela amizade até hoje. Abençoado por ter os melhores na minha vida.

RESUMO

O líquido pirolenhoso (LP) pode ser um coproduto da produção de carvão vegetal e possui uma diversa variedade de compostos químicos, entre eles álcoois, aldeídos, cetonas, furfural, ácidos e compostos fenólicos. Apesar da sua diversidade química, o LP ainda é subutilizado por falta de estudos em virtude da sua composição. Já existem pesquisas que comprovam sua ação antimicrobiana, contudo, são escassas e pouco difundidas no meio acadêmico. As infecções microbianas representam uma ameaça à saúde pública. Ainda, o desenvolvimento de resistência microbiana constitui-se em um dos principais problemas de saúde pública, fenômeno que tem incentivado a busca por novas substâncias com toxicidade seletiva e capacidade de inibir o crescimento microbiano. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a composição química do LP oriundo de diferentes temperaturas de pirólise e sua atividade antimicrobiana frente às linhagens padrão de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. A destilação fracionada foi usada como método de purificação do líquido. Para avaliar os grupos químicos funcionais, utilizou-se o espectrofotômetro no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada por meio do método de difusão em disco e a concentração inibitória mínima (CIM) determinada por microdiluição. Os resultados demonstraram que o maior rendimento em LP foi de 47,39% na temperatura de 650 °C; o pH do LP sofreu alterações de acordo com a temperatura de pirólise; supõe-se que, por meio da análise de FTIR, a temperatura de pirólise não influenciou na composição química do LP produzido nas temperaturas utilizadas nesse estudo. Não houve formação de halo de inibição nos discos que continham LP para a linhagem de *Candida albicans*. Contudo, para as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, o líquido obtido a partir da temperatura de pirólise de 650 e 750 °C, promoveu a formação de um pequeno halo de inibição de aproximadamente 1 mm. Sugere-se que os discos de papel tenham retido os componentes ativos e por isso optou-se por realizar o teste de CIM nos LP's produzidos nas temperaturas de 650 e 750 °C frente às bactérias *E. coli* e *S. aureus*. O presente estudo confirmou a atividade antimicrobiana do LP produzidos a 650 e 750 °C sobre *E. coli* e *S. aureus* com efeito bactericida na concentração superior a 1%.

Palavras chave: destilação fracionada; microrganismos patogênicos; FTIR; CIM.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Objetivos	11
1.1.1 Objetivo geral.....	11
1.1.2 Objetivos específicos	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Ação do calor da madeira	13
2.1.1 Degradação térmica da celulose.....	13
2.1.2 Degradação térmica da hemicelulose	15
2.1.3 Degradação térmica da lignina	15
2.2 Variáveis do processo de pirólise.....	16
2.3 Composição química do líquido pirolenhoso	17
2.4 Estrutura celular bacteriana e fúngica.....	18
2.5 Principais patógenos de importância clínica	20
2.5.1 <i>Escherichia coli</i>	20
2.5.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	21
2.5.3. <i>Candida albicans</i>	21
2.6 Uso do líquido pirolenhoso como agente antimicrobiano	22
3. METODOLOGIA.....	24
3.1 Matéria prima e pirólise dos materiais lenhosos	24
3.2 Processamento e caracterização química do líquido pirolenhoso.....	24
3.3 Avaliação da atividade antimicrobiana	25
3.4 Concentração inibitória mínima (CIM).....	26
3.5 Concentração bactericida mínima (CBM).....	27
3.6 Análise de dados.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1 Rendimentos da pirólise.....	28
4.2 Potencial hidrogeniônico (pH)	28
4.3 Espectrofotômetro por Transformada de Fourier (FTIR)	29
4.4 Avaliação da atividade antimicrobiana por disco-difusão.....	31
4.5 Concentração inibitória mínima (CIM).....	33
5. CONCLUSÕES	36
6. REFERÊNCIAS.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipos de pirólise e suas diferenças.....	17
Tabela 2. Composição química do líquido pirolenhoso.....	18
Tabela 3. Determinação do potencial hidrogeniônico do destilado de líquido pirolenhoso em função da temperatura de pirólise.....	29
Tabela 4. Identificação dos grupos funcionais do líquido pirolenhoso destilado.	31
Tabela 5. Resultado da CIM do líquido pirolenhoso produzidos a 650 e 750 °C frente <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> . Sinal “–” ausência de crescimento microbiano; Sinal “+” presença de crescimento microbiano.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais compostos derivados da pirólise da celulose.....	14
Figura 2. Formação de monômeros a partir de oligômeros da lignina durante as reações secundárias.	16
Figura 3. Esquema representativo da parede celular de bactérias de gram positivo e negativo.....	19
Figura 4. Esquema representativo da parede celular dos fungos.....	20
Figura 5. Esquema representativo do teste de disco-difusão contendo líquido pirolenhoso.....	26
Figura 6. Desenho experimental do ensaio de microdiluição em placa para testagem da concentração inibitória mínima do líquido pirolenhoso destilado produzido nas temperaturas de pirólise de 650 e 750°C frente às linhagens de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	27
Figura 7. Rendimento em líquido pirolenhoso em função da temperatura de pirólise.	28
Figura 8. Análise de FTIR realizada em líquido pirolenhoso destilado obtido nas temperaturas entre 450 e 750 °C.	30
Figura 9. Resultado do teste por disco-difusão do líquido pirolenhoso obtido em diferentes temperaturas frente a <i>E. coli</i> (A), <i>S. aureus</i> (B) e <i>C. albicans</i> (C).	32
Figura 10. Plaqueamento dos poços do teste de CIM do líquido pirolenhoso nas concentrações de 50 a 10% (A) e 5 a 0,25% (B e C) frente <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> para verificação do efeito bactericida ou bacteriostático.	34

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e, ao mesmo tempo, o maior consumidor de carvão vegetal do mundo. Somente no ano de 2020, foram produzidos aproximadamente 6,2 milhões de toneladas de carvão vegetal, representando 12% da produção mundial (EPE, 2021).

O carvão vegetal é produzido por meio do processo de pirólise ou carbonização, que consiste na exposição térmica da madeira em um ambiente com atmosfera com ausência total ou entrada controlada de oxigênio. Desse processo, o carvão vegetal é apenas uma fração dos produtos que podem ser obtidos. Por meio da pirólise, formam-se três produtos: o carvão vegetal, o líquido pirolenhoso (LP) (uma fração volátil composta por vapores orgânicos condensáveis) e os gases não condensáveis (GREWAL *et al.*, 2018). Na prática, para recuperar o LP da pirólise da madeira, os cilindros, geralmente metálicos, são acoplados aos fornos de produção. Posteriormente, após o resfriamento, o LP normalmente precisa passar por um processo de separação, que pode ser feito por decantação ou destilação, para a separação do alcatrão, composto de coloração marrom escura, muito tóxico e indesejável, principalmente no ramo da agricultura (ARAÚJO, 2018).

O LP é um composto ácido e carrega uma diversa família de compostos orgânicos, entre os quais álcoois, cetonas, compostos fenólicos, ácido acético e alguns derivados de lignina, e outros diversos, ainda desconhecidos (MAEKAWA, 2002; SURESH *et al.*, 2019). Loo (2008), aponta que 80% do LP é composto de água e uma série de componentes químicos, com ênfase no álcool metílico, ácido acético e acetona. É importante mencionar que as propriedades e características deste composto dependem de algumas variáveis da pirólise: tipo de pirólise, taxa de aquecimento, temperatura final e a tecnologia/método do sistema de produção. É importante mencionar que a pirólise rápida é recomendada quando o interesse é no maior rendimento dos produtos líquidos e/ou gasosos (ALMEIDA *et al.*, 2018; GREWAL *et al.*, 2018).

Apesar da sua diversidade química, o LP ainda é subutilizado por falta de estudos sobre sua composição, sendo utilizado principalmente na agricultura como inseticida, adubo e fertilizante. A fim de expandir o seu uso e verificar seu mais elevado potencial na área bioquímica, alguns estudos estão sendo realizados. Vieira (2019),

verificou a atividade antifúngica do LP de eucalipto e, para o fungo *Candida albicans* testado, houve a presença de halos de inibição. Jankowsky (2019), testou a ação bactericida do LP de bambu frente a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, onde também foi observado a inibição do crescimento microbiano. Esses microrganismos podem causar uma série de complicações para o ser humano e por isso, é importante a contribuição de estudos para a área.

Especificamente em 2017, 11 milhões de mortes, foram causadas por sepse, que é um conjunto de manifestações graves no organismo produzidas por uma infecção por meio de patógenos bacterianos, fúngicos, virais e parasitários (RUDD *et al.*, 2020). Associado ao fato da alta resistência dessas bactérias e fungos perante aos antimicrobianos comerciais disponíveis, é válido investir em pesquisas com abordagem nos produtos oriundos de recursos naturais e que tenham características antimicrobianas (DE MEDEIROS, 2013; ARAÚJO, 2018). Com isso, esse trabalho contribui para a valorização dos produtos derivados da biomassa, em específico, o LP e sua aplicação na indústria farmacêutica.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

- Avaliar a composição química do líquido pirolenhoso (LP) oriundo de diferentes temperaturas de pirólise e sua atividade antimicrobiana frente às linhagens padrão de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*.

1.1.2 Objetivos específicos

- Analisar os rendimentos dos LP's nas temperaturas finais de pirólise de 450, 550, 650 e 750 °C.
- Realizar a purificação dos LP's por meio da destilação fracionada.
- Determinar o pH dos LP's em função da temperatura de pirólise.
- Analisar os padrões de espectroscopia de infravermelho (FTIR) para os LP's destilados produzidos em diferentes temperaturas de pirólise.
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos LP's por disco-difusão.

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos LP's para as linhagens selecionadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ação do calor da madeira

A madeira é uma biomassa do tipo lignocelulósica e é composta basicamente de três constituintes: celulose, hemicelulose e lignina. Geralmente, a proporção média desses materiais fica entre 40-47% de celulose, 27-35% hemicelulose e 16-31% de lignina (PEDRAZZI *et al.*, 2020).

A celulose é um polissacarídeo que se apresenta como um polímero de cadeia linear constituindo única e exclusivamente de unidades de β -D-anidroglicopiranosose (glicose) unidas por ligações do tipo (1-4), e possuindo uma estrutura organizada e parcialmente cristalina (PEREZ; BRECHA, 2015). A hemicelulose é um polissacarídeo heterogêneo e está ligado à superfície das fibrilas de celulose e forma uma matriz amorfa. É termo-quimicamente sensível e inclui arabinoxilano, glucomanas, glucuronoxilanas, xilanas e xiloglucanas (PEREZ; BRECHA, 2015). Xilana é o principal componente das hemiceluloses. A lignina é composta de polímeros fenólicos não lineares, quimicamente diversos e com ligações reativas fracas (CHEN *et al.*, 2017). A lignina é relativamente hidrofóbica e aromática. É constituída de unidades de fenilpropano, unidas por ligações éter (C-O-O) e carbono/carbono (C-C), respectivamente. A base de álcoois contidos na lignina são: fidoxifenil, ligninas guaiacil e siringil, formando os monolignóis de álcool paracumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (CHEN *et al.*, 2017).

Estes compostos submetidos a ação do calor, como na pirólise, se transformam em diferentes categorias de compostos químicos (FIGUEROA; MORAES, 2021). Antes de abordar esse assunto, é interessante reforçar que, na pirólise, há dois tipos de reações principais: a primária e a secundária. As reações primárias acontecem nas paredes celulares e são responsáveis pela formação de líquidos ou produtos voláteis. Reações secundárias acontecem quando os produtos da reação primária são expostos à ação de catalisadores naturais e calor (PEREZ; BRECHA, 2015).

2.1.1 Degradação térmica da celulose

Durante a pirólise, a parte cristalina e amorfa da celulose se degrada e se decompõe em unidades de açúcar menores. Das reações primárias, são produzidos

os compostos: levoglucosana, celobiosana e oligo-anidro-açúcares. Das reações secundárias, esses produtos primários são convertidos em moléculas maiores. Esses compostos são menos prováveis de evaporar devido às condições da pirólise e a sua remoção se dá por um mecanismo chamado ejeção térmica. Os produtos formados nessa reação incluem acetol, hidroxiacetaldeído e ácido acético (PATWARDHAN *et al.*, 2011).

Válido ressaltar que esses produtos serão influenciados pelo tipo de pirólise realizada (lenta ou rápida) onde conceito será abordado no próximo tópico. A degradação da celulose para obtenção desses compostos acontece sob condição de taxa de aquecimento alta, numa temperatura acima de 300 °C. Em condições de taxa de aquecimento baixas, a parte amorfa da celulose derrete nessa mesma faixa de temperatura, porém a parte cristalina permanece sólida devido a reações de reticulação, ou seja, envolve uma reação química entre as cadeias de polímero para ligá-las, fortalecendo-as (WANG *et al.*, 2013).

Na Figura 1 são apresentados os principais produtos (primários e secundários) da pirólise da celulose.

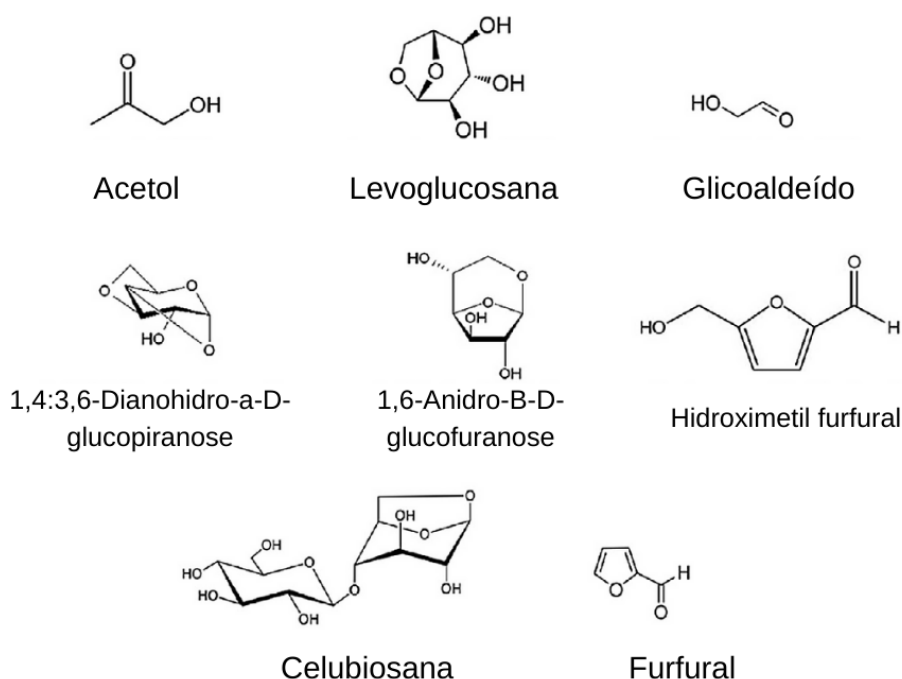


Figura 1. Principais compostos derivados da pirólise da celulose.

Fonte: PEREZ; BECHA (2015).

2.1.2 Degradação térmica da hemicelulose

A faixa de temperatura de degradação (primária) da hemicelulose é bem próxima da parte amorfa da celulose: 250-300 °C. Já é conhecido que compostos como ácido acético, ácido fórmico, acetol, furfural são produzidos da hemicelulose quando submetido a pirólise (PATWARDHAN *et al.*, 2009).

2.1.3 Degradação térmica da lignina

Dependendo da faixa de temperatura da pirólise, a lignina pode ter reações distintas. Pirólises com temperaturas entre 180 e 300 °C produzem oligômeros de lignina, que posteriormente se quebram e formam monômeros, conforme a Figura 2. Um líquido intermediário é formado quando moléculas largas não são capazes de evaporar nestas condições de baixa temperatura. Como consequência, irá acontecer reticulação (*cross-link*) e formar carvão. Às altas temperaturas, em torno de 300-600 °C, a lignina na fase intermediária líquida irá reticular e criar um sólido carbonáceo poliaromático (PEREZ; BRECHA, 2015). Produtos colaterais importantes da formação de carvão são a liberação de metanol e formaldeído. Nessas altas temperaturas, os oligômeros de lignina em fase de vapor irão rachar para formar monômeros conforme os vapores percorrem para fora do reator (COSTA, 2019).

Também ocorre a formação de compostos aromáticos formados por recombinação que foram gerados na degradação primária. Posteriormente podem-se formar aldeídos, cetonas e furanos, visto que a concentração de fenóis e hidrocarbonetos aromáticos diminui à medida que a concentração das cetonas e aldeídos aumenta (SILVA, 2013).

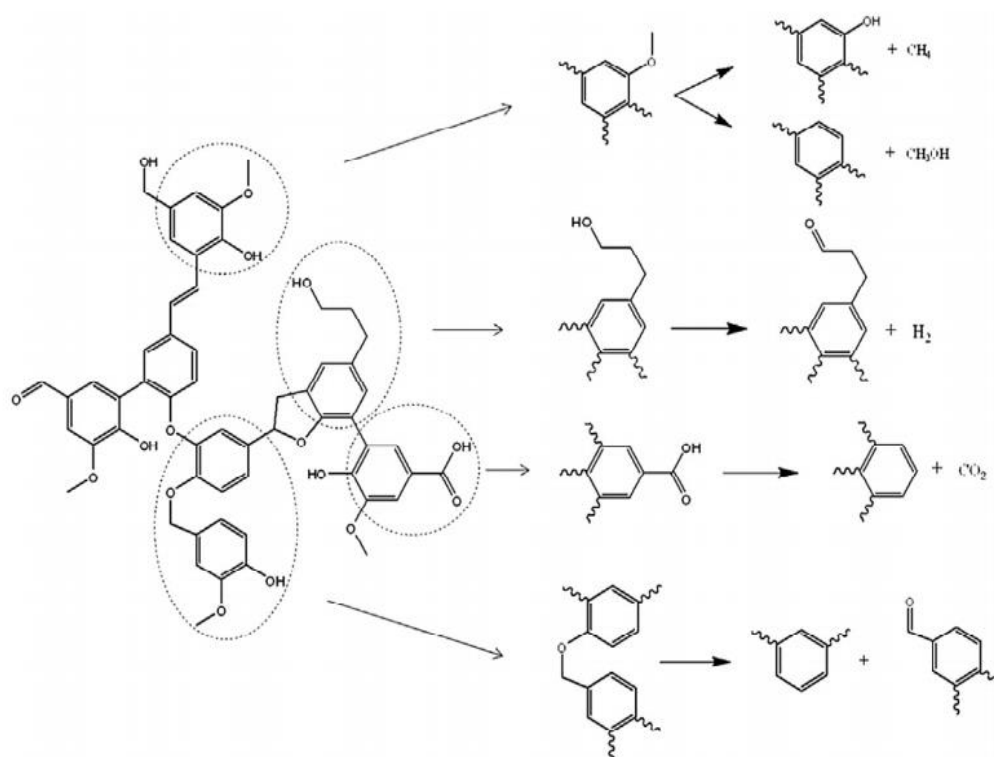


Figura 2. Formação de monômeros a partir de oligômeros da lignina durante as reações secundárias.

Fonte: (ZHOU *et al.*, 2013).

2.2 Variáveis do processo de pirólise

Pirólise é o termo usado para a decomposição térmica da biomassa na ausência total ou parcial de oxigênio, que gera gás, vapores condensáveis (líquido pirolenhoso) e carvão. Uma das classificações da pirólise é atribuído como pirólise lenta (*slow*) ou rápida (*flash*). Um dos pontos que se difere entre esses dois processos é o que se deseja obter como produto. A pirólise lenta está focada na produção de carvão vegetal, enquanto a rápida se concentra nos produtos líquidos e/ou gasosos, onde apresentam maiores rendimentos (DABROS *et al.*, 2018; GREWAL *et al.*, 2018; TRINH *et al.*, 2013). A Tabela 1 apresenta a diferença entre esses dois processos.

Tabela 1. Tipos de pirólise e suas diferenças.

Tipo	Temperatura °C	Taxa de aquecimento	Rendimentos (%)		
			Líquido	Gás	Carvão
Lenta	400	<10 °C/min	30	35	35
Rápida	600	10 - 200 °C/s	75	25	25

Fonte: adaptado de PERKINS *et al.* (2018).

Um dos parâmetros que interfere no rendimento desses produtos é a granulometria da matéria-prima. Como a pirólise rápida prioriza a produção de líquido é desejável que a granulometria do material seja <2 mm, ao passo que a priorização do carvão vegetal, o recomendado é que seja >2 mm. Na pirólise lenta, apesar do produto final ser o carvão vegetal, a parte aquosa do LP que pode ser recuperado pode conter componentes valiosos como: acetonas/ketonas (5% de rendimento de massa seca de madeira), de metanol (1-2%), e ácido acético e fórmico (5-8%) (PEREZ; BRECHA, 2015).

Entre os vários tipos de reatores utilizados na produção do líquido, o reator de leito fluidizado aparenta ser mais econômico e facilmente escalonável e, portanto, muito comumente usados para pirólise rápida de biomassa (MAITY, 2015; MESA *et al.*, 2003). A temperatura de pirólise e a taxa de aquecimento são parâmetros que também têm grande influência no processo de pirólise. Temperaturas mais elevadas e maiores velocidades de aquecimento aumentam a quebra das ligações e favorecem a produção de pequenas moléculas (PARADELA, 2012).

2.3 Composição química do líquido pirolenhoso

A composição química do LP varia de acordo com a biomassa utilizada além dos parâmetros de processo da pirólise, como a temperatura, a taxa de aquecimento e método de obtenção. O líquido é uma mistura complexa de substâncias formadas da quebra e da despolimerização dos três principais polímeros contidos na biomassa: celulose, hemicelulose e lignina. A partir disso, quimicamente, o líquido possui muita água e cerca de 400 compostos orgânicos que pertencem a ácidos, álcoois, cetonas, aldeídos, fenóis, éteres, ésteres, açúcares, furanos, compostos de nitrogênio e

compostos multifuncionais (DABROS *et al.*, 2018; NEGAHDAR *et al.*, 2016; PERKINS *et al.*, 2018).

Na Tabela 2, estão apresentados os principais compostos químicos do LP a partir de madeira.

Tabela 2. Composição química do líquido pirolenhoso.

Grupos Funcionais	Compostos
Água	Água
Ácidos	Fórmico, acético, propanoico, butanoico, pentanoico, glicólico, hexanoico
Aldeídos	Furfural, formaldeído, 2-butanone
Álcoois	Metanol, etanol, 2-propene-1-ol, butanol, fenil etílico, etileno glicol, propileno glicol, 2,3-butanodiol, ciclopentanol, ciclohexanol, 1,2 ciclohexanediol
Carboidratos	Celobiosana, levoglucosana
Compostos fenólicos	Fenol, cresóis, guaiacóis, siringóis, vanilina
Cetonas	Acetol, ciclopentanona, ciclohexanona, metilciclopentanona, 3-metil-1,2-ciclopentanediona, 2-pentanona

Fonte: Adaptado de CHENG *et al.* (2021); DABROS *et al.* (2018); MEDEIROS (2019); PEREZ; BRECHA (2015); PERKINS *et al.* (2018); VIEIRA (2019).

2.4 Estrutura celular bacteriana e fúngica

A célula bacteriana por ser procariótica, apresenta uma estrutura que contém a membrana citoplasmática e a parede celular. A membrana citoplasmática serve como barreira física que tem o intuito de resguardar o conteúdo intracelular, ao passo que a parede celular fornece resistência e estrutura à célula bacteriana, de forma que

assegure sua sobrevivência. O rompimento da membrana citoplasmática ocasiona o extravasamento do citoplasma, que leva à morte celular. A integridade da membrana é um fator crítico para o crescimento bacteriano, permitindo a passagem de pequenos íons K^+ , H^+ , Na^+ e Ca^{2+} . Em caso de alguma alteração desses íons, pode ocasionar uma disfunção da membrana e comprometer seus processos de transporte e energia, e devido a isso, essas mudanças podem afetar seu metabolismo e levar a célula à morte (ALBANO, 2016; COX *et al.*, 2001).

As bactérias podem ser divididas em gram positivas e negativas de acordo com a composição química da parede celular. As bactérias gram-positivas possuem cerca de 90% da parede constituídas de camadas de peptidoglicano e também por ácidos teicóicos, enquanto as bactérias gram-negativas possuem apenas 10% da parede celular constituídas de peptidoglicano e possuem uma membrana exterior compostas por lipopolissacarídeos e proteínas (porinas e lipoproteínas). A Figura 3 ilustra a diferença entre essas duas estruturas (ALBANO, 2016; CONCEIÇÃO *et al.*, 2018; SILVA, 2013).

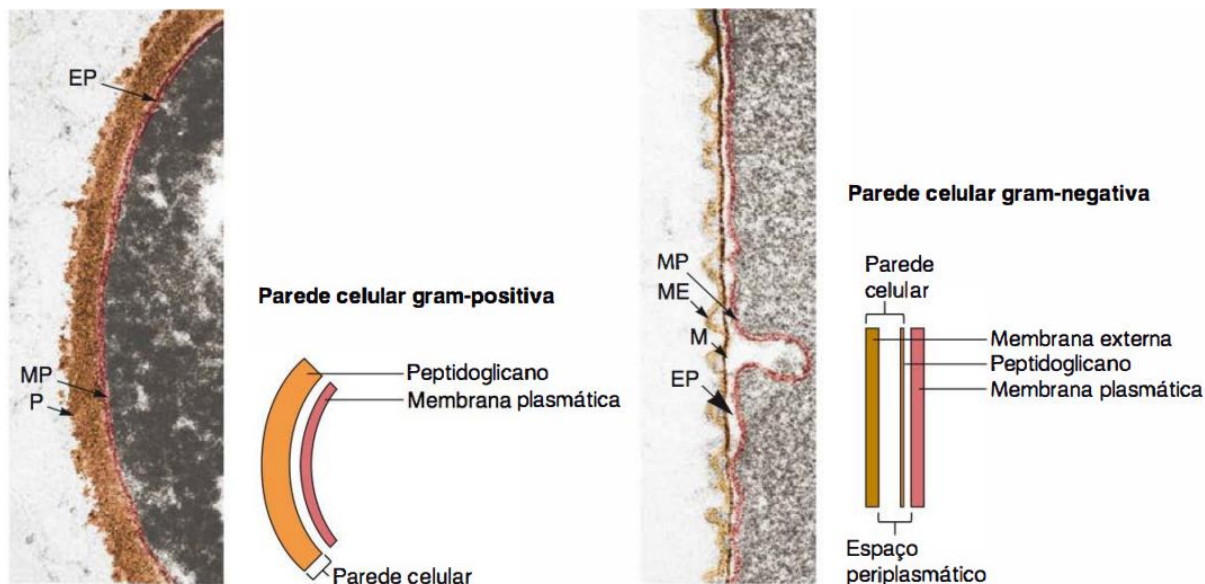


Figura 3. Esquema representativo da parede celular de bactérias de gram positivo e negativo.

Fonte: (BROOKS *et al.*, 2014).

A parede celular do fungo é uma estrutura complexa de polissacarídeos e proteínas interconectados. Geralmente, a camada interna da parede celular do fungo

é composta por uma matriz de quitina-glucana altamente reticulada que consiste em cadeias de β -1,3- e β -1,6-glucana seguida por uma camada externa rica em proteínas manosiladas. Na parede celular do fungo, a quitina, um polímero de N-acetilglucosamina ligada a β -1,4, se reúne em microfibrilas devido à ligação de hidrogênio entre as cadeias e adota uma estrutura cristalina (Figura 4) (TANAKA; KAHMAN, 2021).

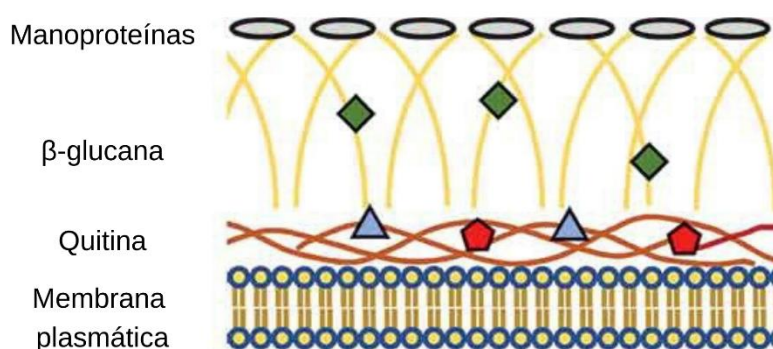


Figura 4. Esquema representativo da parede celular dos fungos.

Fonte: Adaptado de TANAKA; KAHMAN (2021).

2.5 Principais patógenos de importância clínica

2.5.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria gram-negativa pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Trata-se de uma bactéria com formato de bacilo, anaeróbia facultativa, comensal e predominante na microbiota intestinal de muitos animais, inclusive o homem. No entanto, *E. coli* é um importante problema clínico e epidemiológico em infecções tanto relacionadas a pacientes hospitalizados e imunocomprometidos. *E. coli* pode ser responsável por gastroenterite, disenteria e síndrome hemolítico-urêmica, infecção do trato urinário e sepse e meningite (BROOKS *et al.*, 2014; KAPER, 2005). As gastroenterites provocadas por *E. coli* podem ser divididas em cinco subtipos: *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC); *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), conhecida também por produzir a toxina Shiga (STEC); *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC); *Escherichia coli*

enteropatogênica (EPEC) e *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) (FERNANDES *et al.*, 2021; MUELLER; TAINTER, 2021).

E. coli conseguem sobreviver na presença de fatores ambientais limitantes e condições hostis do hospedeiro devido a capacidade de adaptação do estado fisiológico e atividades celulares. Os desafios na eliminação deste patógenos aumentaram devido aquisição de fatores de virulência e resistência, que lhes permitiram adaptar a novos nichos e favorecer a sua disseminação, tanto na comunidade como em hospitais. Atualmente, ocupa o terceiro lugar da lista dos 12 patógenos prioritários resistentes a antibióticos descritos pela Organização Mundial da Saúde (DENAMUR *et al.*, 2021).

2.5.2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus faz parte do grupo estafilococos, que são células esféricas gram-positivas (TAYLOR; UNAKAL, 2021). Algumas dessas bactérias fazem parte da microbiota da pele e das mucosas de seres humanos saudáveis, porém podem ser patógenos oportunistas e causarem diversas infecções, especialmente se o sistema imunológico do hospedeiro se encontra enfraquecido. Das 40 espécies do gênero *Staphylococcus*, o *S. aureus* é um dos mais importantes clinicamente, e o único coagulase-positivo, ou seja, é capaz de produzir uma enzima que por sua vez, possui capacidade hemolítica. O *S. aureus* pode ser responsável por infecções de pele e tecidos moles, pneumonia, septicemia, endocardite infecciosa e infecções de ossos e articulações (BROOKS *et al.*, 2014).

Pode ser encontrada em ambientes hospitalares e com o uso indevido de antimicrobianos, dosagens inadequadas e interrupção precoce do tratamento antimicrobiano, houve o crescente surgimento de cepas multirresistentes, tornando fármacos já existentes ineficazes, e dificultando ainda mais seu tratamento (FANIN *et al.*, 2020).

2.5.3. *Candida albicans*

As espécies de *Candida* são comensais e, portanto, fazem parte da microbiota humana residente localizadas na pele e na mucosa dos tratos gastrointestinais e genitais. A candidíase tem um espectro clínico diverso, variando de superficial (sem

risco de vida), infecções mucocutâneas, a doença invasiva devastadora associada à candidemia. Alterações na imunidade do hospedeiro, estresse, desequilíbrio na microbiota residente e uso indiscriminado de antibióticos podem levar ao crescimento excessivo de fungos, desencadeando um episódio de candidíase mucocutâneas (NEVILLE; D'ENFERT; BOUGNOUX, 2015).

Entre as diferentes espécies de *Candida*, a *Candida albicans* é mais comumente recuperado (37%) de espécies clínicas (BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020). A *C. albicans* é um organismo polimórfico entre as formas de levedura, pseudo-hifas e hifas. É um patógeno que está presente na mucosa oral, conjuntival e microbiota vaginal onde ela é a principal responsável por causar candidíase na maior parte das situações clínicas. A crescente mortalidade através desse organismo é atribuída ao aumento da candidíase sistêmica invasiva e casos de septicemia, principalmente em pacientes imunodeprimidos (PEREIRA *et al.*, 2020).

A estratégia para o tratamento da candidíase depende do estado imunológico do paciente, localização, e gravidade da infecção. No entanto, semelhante às infecções bacterianas, o surgimento de resistência antifúngica entre as espécies de *Candida* é uma séria ameaça ao público saúde mundial. Segundo Trindade (2021), o uso de doses indevidas de fármacos azólicos, que são fármacos mais comumente utilizados para o tratamento de infecções fúngicas, podem ocasionar o surgimento de cepas mais resistentes.

2.6 Uso do líquido pirolenhoso como agente antimicrobiano

Dentre os grupos químicos que compõem o LP, os compostos fenólicos, que são produzidos principalmente pela degradação da lignina, são conhecidos como um dos principais grupos que possuem propriedades antimicrobianas. Não só compostos fenólicos, mas outras substâncias do LP, como o ácido acético e furfural também possuem tais características (PIMENTA *et al.*, 2018).

O fenol é um componente germicida com atividade bacteriostática e juntamente com o ácido acético, pode potencializar essa atividade (MARUMOTO *et al.*, 2012). Os ácidos orgânicos presentes no LP têm sua ação na acidificação do citoplasma dos microrganismos, onde acontece a alteração do seu metabolismo, já os compostos fenólicos alteram as membranas plasmáticas. Com isso, existe uma sinergia entre

esses dois compostos para fornecer essa atividade antimicrobiana (SOUZA *et al.*, 2018; VIEIRA, 2019).

Jankowsky (2019) utilizou LP de bambu e verificou que o líquido é eficaz para a inibição de *E. coli* e *S. aureus*. Vieira (2019) testou LP's de diversas biomassas, incluindo a de eucalipto e verificou que houve a presença do halo de inibição contra o fungo *C. albicans*. Os dois autores apuraram que os líquidos que possuíam maior concentração de compostos fenólicos tiveram o maior halo de inibição frente a esses microrganismos.

As pesquisas desenvolvidas por Araújo (2018) e Soares (2020) também verificaram halo de inibição frente *E. coli* e *S. aureus* utilizando LP a partir das madeiras de *Eucalyptus urophylla x Eucalyptus grandis* e *Mimosa tenuiflora*.

Diante do exposto, é válido investigar o potencial antimicrobiano de LP's no intuito de pesquisar alternativas de uso e oferecer oportunidade para se agregar mais valor a este composto.

3. METODOLOGIA

3.1 Matéria prima e pirólise dos materiais lenhosos

O líquido pirolenhoso usado neste estudo foi obtido da pirólise da madeira de eucalipto oriunda de um plantio experimental do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. O processo de pirólise foi feito em um forno tipo mufla e para a coleta do líquido montou-se um sistema de recuperação a base de um condensador inox. A pirólise foi feita em quatro temperaturas distintas, sendo a temperatura final o parâmetro norteador: 450, 550, 650 e 750 °C. Para isso, foram utilizados cerca de 300 g de madeira em cavacos, seca por 24 horas em estufa a 103 ± 2 °C com taxa de aquecimento de 6 °C min^{-1} . O tempo de permanência na temperatura final foi de sessenta minutos, com base em metodologia estabelecida previamente (DIAS JÚNIOR *et al.*, 2020).

O LP foi coletado em um balão kitasato e armazenado posteriormente em frascos de vidro. Com base na massa dos componentes, o rendimento em líquido pirolenhoso em relação à madeira seca foi calculado conforme a Equação 1, proposto por DIAS JÚNIOR *et al.*, (2020).

$$\text{RLP} = \text{Mlp} / \text{Mm} * 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Em que: RLP = rendimento em líquido pirolenhoso (%); Mm = massa seca da madeira (g); Mlp = massa do líquido pirolenhoso (g).

3.2 Processamento e caracterização química do líquido pirolenhoso

O líquido pirolenhoso oriundo de cada temperatura de pirólise foi submetido a um processo de purificação para a análise dos compostos químicos e as propriedades físico-químicas. Para a purificação do líquido utilizou-se o método de destilação fracionada, com o auxílio da coluna de vidro tipo Vigreux acoplado a um condensador. Foram utilizados 300 mL de líquido bruto de cada temperatura.

O potencial hidrogeniônico (pH) do líquido pirolenhoso foi determinado com o auxílio de um medidor de pH microprocessado de bancada, modelo Tec-7 da marca Tecnal.

Para avaliar os grupos químicos funcionais do líquido pirolenhoso bruto e destilado utilizou-se o espectrofotômetro no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) no modo experimental de reflectância difusa (DRIFT) utilizando o equipamento Bruker Tensor 27, com 32 scans e amplitude espectral entre 400 a 4000 cm^{-1} com amostra em um acessório de ATR (reflexão total atenuada) com cristal de ZnSe.

3.3 Avaliação da atividade antimicrobiana

Para os experimentos foram utilizada linhagem bacteriana padrão de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e fúngica de *Candida albicans* (ATCC 24433). As culturas foram rotineiramente submetidas à coloração diferencial de gram para garantia da pureza.

A atividade antimicrobiana *in vitro* do líquido pirolenhoso foi avaliada previamente pelo método de disco-difusão de acordo com protocolo do *Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI* (2020). Para este experimento, os microrganismos foram previamente cultivados em caldo *Brain Heart Infusion Broth* (BHI) à 35,5 °C, por 24 horas e a concentração da suspensão microbiana foi ajustada pela escala 0,5 *McFarland*, correspondendo a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL de bactérias e $1,5 \times 10^6$ UFC/ml para fungos, utilizando solução salina estéril (0,9 % de NaCl). O experimento foi realizado em meio ágar *Mueller-Hinton* (MHA) preparado e foi transferido para as placas, e, com auxílio de swab, as linhagens foram semeadas pela técnica de semeadura. Em seguida, discos de papel filtro *Whatman* estéreis (6 mm) contendo 5 μL do líquido pirolenhoso de cada temperatura de pirólise (450, 550, 650 e 750 °C) e controle positivo foram colocados sobre a superfície das placas. Para controle positivo da espécie *C. albicans* foi utilizado Anfotericina B (20 μg /disco), e discos de antibiótico cloranfenicol (30 μg /disco) foram utilizados para controle positivo das espécies *E. coli* e *S. aureus*. Para controle negativo foi utilizado 5 μL de salina. As placas foram incubadas a 36 °C, durante 24 horas. Os testes foram realizados em triplicata. Na Figura 5 pode ser observado o esquema representativo do ensaio de disco-difusão.

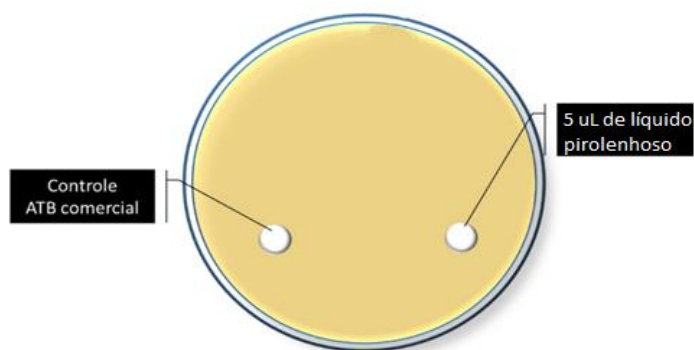


Figura 5. Esquema representativo do teste de disco-difusão contendo líquido pirolenhoso.

Fonte: O autor (2021).

3.4 Concentração inibitória mínima (CIM)

Para determinação da concentração inibitória mínima foi realizado o ensaio de susceptibilidade de microdiluição em placa, usando o método descrito pelo CLSI (2020). Para estes experimentos foram utilizadas as linhagens padrão de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Os ensaios foram realizados em microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços, em triplicata. A mistura de reação final foi um volume de 200 μL (100 μL do inóculo + 100 μL da solução do composto), o meio de cultura utilizado foi o *Caldo Mueller Hinton* (CMH) e a concentração final do inóculo no teste foi de 5×10^5 UFC/mL. Diferentes concentrações decrescentes do líquido pirolenhoso (650 e 750 $^{\circ}\text{C}$) foram testadas: 50; 40; 30; 20; 10; 5; 2,5; 1; 0,5 e 0,25%. Posteriormente, as microplacas foram incubadas a 35 ± 2 $^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

A CIM foi considerada a menor concentração do líquido pirolenhoso capaz de inibir completamente o crescimento (ausência de precipitado ou turvação no meio de cultura) após o período de incubação. Para cada linhagem bacteriana foi feito um controle de crescimento (inóculo + meio de cultura), controle de esterilidade (somente CMH) e controle positivo (inóculo + meio de cultura acrescido de antimicrobiano padrão). Na Figura 6 está representado o esquema do ensaio de microdiluição em placa para as linhagens estudadas.

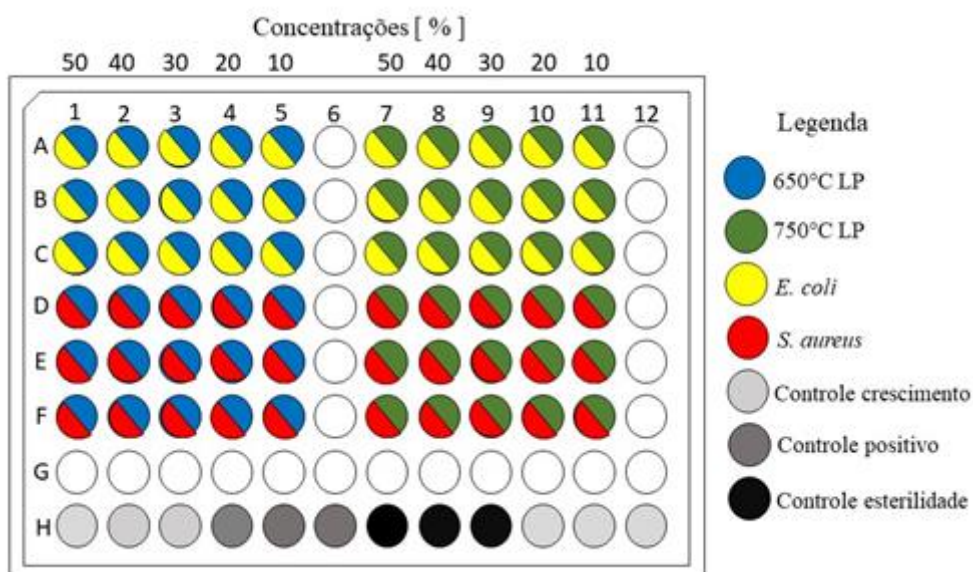


Figura 6. Desenho experimental do ensaio de microdiluição em placa para testagem da concentração inibitória mínima do líquido pirolenhoso destilado produzido nas temperaturas de pirólise de 650 e 750°C frente às linhagens de *E. coli* e *S. aureus*.

Fonte: O autor (2021).

3.5 Concentração bactericida mínima (CBM)

Após o teste de microdiluição em meio líquido, foi feito o plaqueamento dos poços da CIM do líquido pirolenhoso em placas contendo ágar nutriente. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 horas. O resultado foi definido pela ausência ou presença da formação de colônias, sendo a ação classificada como bactericida ou bacteriostática, respectivamente.

3.6 Análise de dados

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos (temperatura de pirólise) e duas repetições. Teste F de análise de regressão foi realizado. Todos os testes foram realizados com intervalo de confiança de 95%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Rendimentos da pirólise

A temperatura de pirólise que forneceu o maior rendimento em líquido pirolenhoso foi 650 °C, com 47,39% (Figura 7).

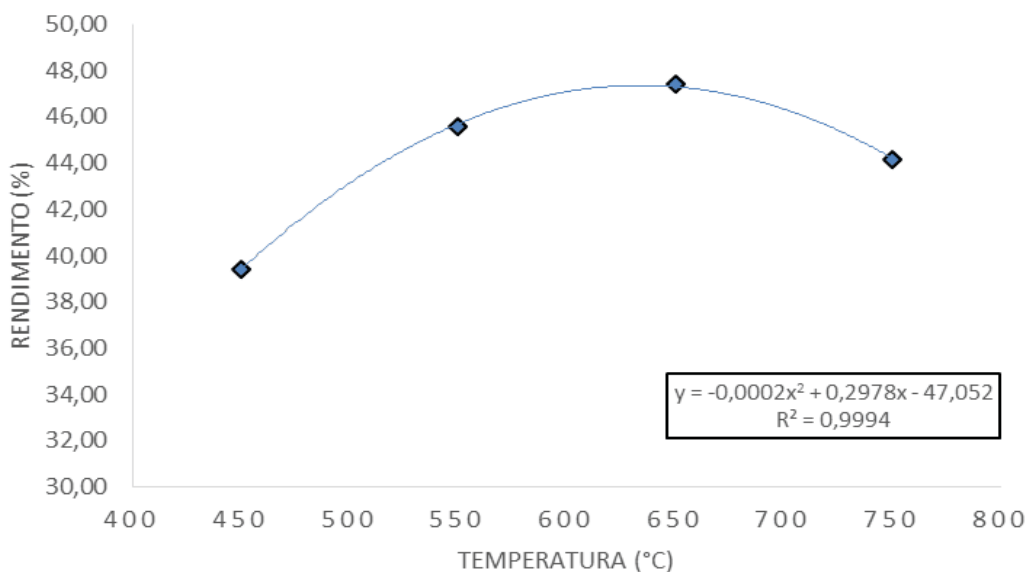


Figura 7. Rendimento em líquido pirolenhoso em função da temperatura de pirólise.

Fonte: O autor (2021).

O rendimento em líquido pirolenhoso obteve aumento até a temperatura de 650 °C e posteriormente decresceu na temperatura de pirólise de 750 °C. Pode-se associar esse comportamento pelo fato de altas temperaturas vaporizarem alguns gases condensáveis, não conseguindo se transformar em líquido pirolenhoso, e conseqüentemente, diminuindo o rendimento (DIAS JÚNIOR *et al.*, 2020).

4.2 Potencial hidrogeniônico (pH)

O valor do pH apresentou alterações em função da temperatura de pirólise (Tabela 3).

Tabela 3. Determinação do potencial hidrogeniônico do destilado de líquido pirolenhoso em função da temperatura de pirólise.

Temperatura (°C)	pH
450	2,7± 0,01
550	2,89 ± 0,01
650	2,87 ± 0,01
750	2,88 ± 0,01

Fonte: O autor (2021).

O pH é um fator ambiental necessário para que ocorra o crescimento bacteriano. A maioria dos microrganismos crescem em pH neutro - 6,0 a 8,0 - (neutrofílicos), embora tenhamos exceções que crescem em meio ácido - 3,0 (acidófilas) e em meio alcalino - 10,5 (alcalófilas) (BROOKS *et al.*, 2014). Para *C. albicans*, o pH ácido favorece a sua proliferação, tendo uma faixa ampla que pode variar de 2,5 até 7,5 (SOARES *et al.*, 2019). *S. aureus* também é um microrganismo que pode crescer em meio ácido, tendo sua faixa ideal de pH variando de 4,0 a 9,0 (TANABE, 2021). Para *E. coli*, a faixa de pH ideal para crescimento é entre 6,0 e 8,0 (BROOKS *et al.*, 2014).

Portanto, supõe-se que, independentemente da temperatura de pirólise, o líquido possui pH ácido que pode interferir no crescimento bacteriano (BROOKS *et al.*, 2014). Em contrapartida, *C. albicans* possui uma variação de crescimento em pH bem amplo, e por esse motivo, pode proporcionar resistência ao líquido.

4.3 Espectrofotômetro por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR para as diferentes temperaturas de pirólise, estão apresentados na Figura 8. Os grupos funcionais relevantes foram identificados e inseridos na Tabela 4.

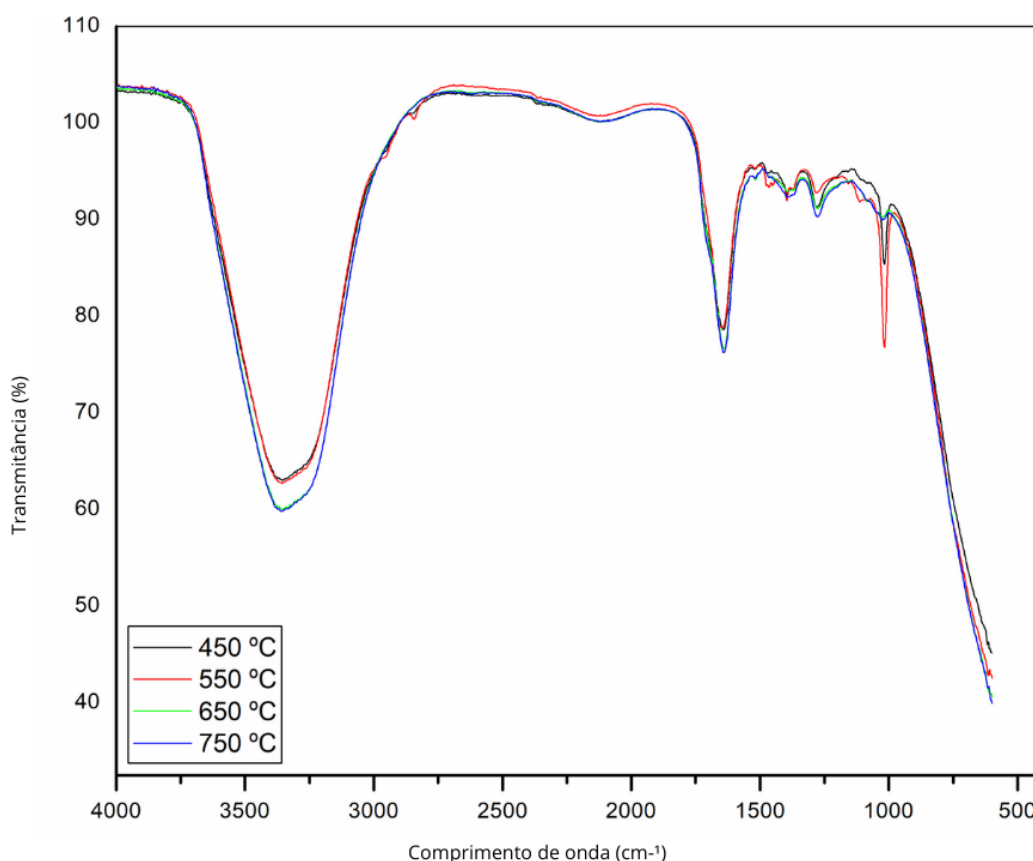


Figura 8. Análise de FTIR realizada em líquido pirolenhoso destilado obtido nas temperaturas entre 450 e 750 °C.

Fonte: O autor (2021).

A vibração próxima do comprimento de onda em 3355 cm^{-1} indica grupamentos de ligação do tipo O-H, que podem ser relacionadas a presença de umidade ou água. Para as bandas próximas de 1640 cm^{-1} pode ser atribuído a presença de anéis aromáticos presentes em cetonas conjugadas. As bandas de 1395 e 1275 cm^{-1} podem estar associadas a presença de grupamento amina. A banda localizada próxima de 1000 cm^{-1} é referente a desdobramentos aromáticos C-H (PORTO *et al.*, 2019; VIEIRA, 2019).

Analisando a Figura 8, pode-se perceber que os espectros se comportam de maneira semelhante, apresentando os mesmos picos de absorção para todas as temperaturas de pirólise (Tabela 4). A única diferença no comportamento do gráfico se dá na intensidade de absorção dos picos, sendo mais acentuados ou brandos em determinada faixa de comprimento de onda. Portanto, a partir destes dados, supõe-

se que a temperatura de pirólise não influenciou na composição química do líquido do presente estudo.

Tabela 4. Identificação dos grupos funcionais do líquido pirolenhoso destilado.

Comprimento de onda (cm⁻¹)	Estiramento	450°C	550°C	650°C	750°C
3355	O - H	3354,04	3355,30	3555,25	3555,13
1640	-COOH, C=O	1642,72	1649,71	1639,52	1640,30
1395	C=C	1395,66	1395,65	1394,27	1395,78
1275	C≡C	1277,80	1280,31	1275,78	1275,98
1020	C-H	1016,97	1016,70	1020,95	1022,94

Fonte: O autor (2021).

4.4 Avaliação da atividade antimicrobiana por disco-difusão

O teste de disco-difusão foi utilizado para avaliar preliminarmente a atividade antimicrobiana do líquido pirolenhoso frente a *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*.

Após a incubação por 24 horas, os resultados do teste de susceptibilidade pelo método de disco-difusão estão apresentados na Figuras 9.

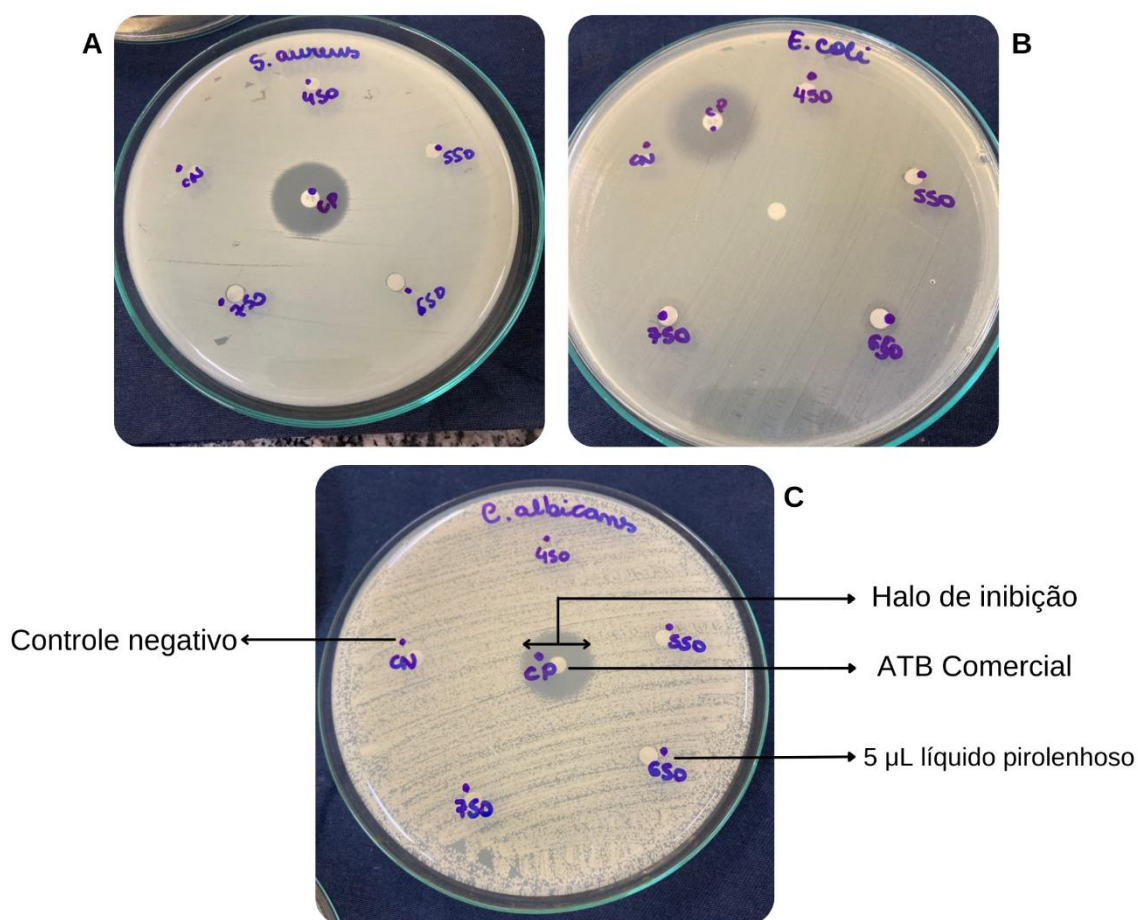


Figura 9. Disco-difusão do líquido pirolenhoso obtido em diferentes temperaturas frente a *E. coli* (A), *S. aureus* (B) e *C. albicans* (C).

Fonte: O autor (2021).

Observou-se a formação de zonas de inibição para os controles positivos utilizados, de acordo com o padrão recomendado para a realização dos ensaios. Não houve formação de halo de inibição nos discos que continham líquido pirolenhoso para a linhagem de *C. albicans* (Figura 9). Contudo, para as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, nas temperaturas de 650 e 750 °C, observou-se a formação de um pequeno halo de inibição de aproximadamente 1 mm.

Trabalhos recentes que avaliaram atividade antimicrobiana com o uso do líquido pirolenhoso, não utilizaram o método de difusão com discos de papel, mas sim, o método de perfuração em ágar (ARAÚJO, 2018; SOARES, 2020; VIEIRA, 2019). Nessa técnica, a remoção do meio de cultura sólido é realizada com auxílio de cilindros de 6-8 mm de diâmetro para a formação de poços, nos quais é possível a aplicação direta das substâncias a serem analisadas (OTROSKY *et al.*, 2008). Um estudo feito por Maia-Araújo *et al.* (2011) compara as duas técnicas na avaliação da

sensibilidade antibacteriana, e conclui que, apesar de não apresentarem diferença significativa no resultado final, o teste de difusão com disco de papel não garante a quantidade exata que cada disco de papel consegue absorver quando embebido no extrato, dificultando a obtenção de resultados mais precisos quando comparado com a técnica de poços.

Sugere-se então, que o uso de discos de papel impregnados com líquido pirolenhoso possa ter influenciado neste resultado. Como os componentes do líquido têm elevado peso molecular, podem ter dificuldade de difundir do papel para o meio. Além disso, os compostos bioativos, podem ter se ligado ao papel e comprometeram a difusão no meio. Para ter certeza de que a *C. albicans* realmente foi resistente contra o líquido por conta da resistência do crescimento em meio ácido, futuros trabalhos podem realizar os ensaios de sensibilidade diretamente na placa de poços.

Por esse motivo, optou-se por realizar o teste de CIM com os LP's produzidos nas temperaturas de 650 e 750 °C frente às bactérias *E. coli* e *S. aureus*, onde os testes foram feitos em uma placa de poliestireno com poços, de maneira que o líquido pirolenhoso esteve em contato direto com o meio de cultura.

4.5 Concentração inibitória mínima (CIM)

Confirmada a existência de atividade antimicrobiana do líquido pirolenhoso extraído nas temperaturas de 650 e 750 °C, foi realizado ensaio de susceptibilidade pelo método de microdiluição em placa para determinação da CIM frente a *E. coli* e *S. aureus*. Segundo Aligiannis *et al.* (2001), a CIM se refere à menor concentração de um composto capaz de impedir a proliferação microbiana.

No presente trabalho, o valor obtido para CIM foi de 1% para os líquidos de pirólise a 650 e 750 °C (Tabela 5). Após identificação da CIM, os poços contendo as concentrações de 0,25, 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 % foram semeados em meio sólido por ágar nutriente (Figura 10). Após o período de incubação, observou-se o crescimento de microrganismos na placa oriunda do poço contendo 0,25 e 0,5 % de LP e a ausência de UFC na placa oriunda do poço contendo o líquido a 1% e demais concentrações mais altas. O presente estudo confirmou a atividade antimicrobiana dos líquidos de pirólise a 650 e 750 °C sobre *E. coli* e *S. aureus* com efeito bactericida na concentração superior a 1%.

Tabela 5. CIM do líquido pirolenhoso produzidos a 650 e 750 °C frente *E. coli* e *S. aureus*. Sinal “-” “ausência de crescimento microbiano; Sinal “+” presença de crescimento microbiano.

	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		
	650 °C	750 °C	650 °C	750 °C	
Concentração do líquido (%)	50	-	-	-	
	40	-	-	-	
	30	-	-	-	
	20	-	-	-	
	10	-	-	-	
	5	-	-	-	
	2,5	-	-	-	
	1	-	-	-	
	0,5	+	+	+	+
	0,25	+	+	+	+

Fonte: O autor (2021).

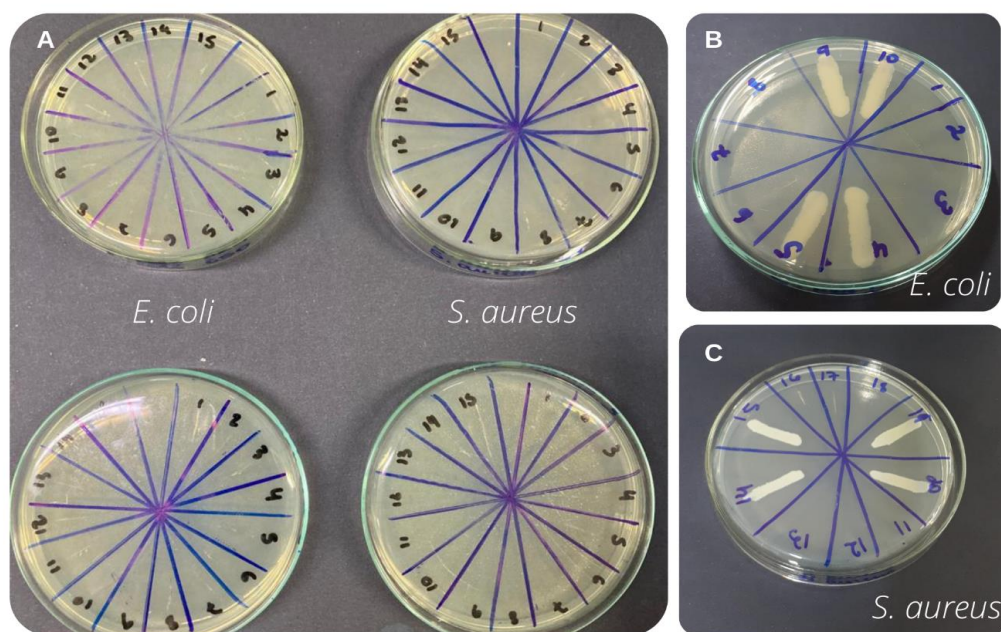


Figura 10. Plaqueamento dos poços do teste de CIM do líquido pirolenhoso nas concentrações de 50 a 10% (A) e 5 a 0,25% (B e C) frente *E. coli* e *S. aureus* para verificação do efeito bactericida ou bacteriostático.

Fonte: O autor (2021).

A mesma CIM para os LP's produzidos em diferentes temperaturas frente às duas bactérias, pode ser embasado pela análise de FTIR (Figura 8) onde indica que os grupos químicos presentes no LP não se alteram de acordo com a temperatura de pirólise. Supõe-se que as temperaturas de 450 e 550 °C também tenham resultados semelhantes, baseado na análise de FTIR feita, que indica ter a mesma composição química independente da temperatura de pirólise. Também não se pode descartar a hipótese de que o disco de papel tenha interferido no teste de disco-difusão. Contudo, para comprovação, futuros trabalhos podem realizar outros métodos para o teste de sensibilidade ou testarem diretamente em poços.

Resultados semelhantes já foram relatados. A CIM do presente estudo utilizando destilado do líquido pirolenhoso de eucalipto, teve resultado similar a um estudo feito por Fernandes *et al.* (2019), que utilizaram o líquido pirolenhoso bidestilado obtido a partir de eucalipto pirolisado a 450 °C para testar a sua ação antimicrobiana frente a *S. aureus* (ATCC 25923) e obtiveram concentração inibitória mínima de 0,78%. Um estudo feito por Chiamenti *et al.* (2016) encontrou a CIM de 3% do líquido pirolenhoso feito a partir da madeira de acácia negra (*Acacia mearnsii* De Wild) frente *E. coli* (ATCC 25922).

Estes são resultados preliminares e que para eventual aplicação em produtos deve-se levar em consideração que outros estudos ainda são necessários, como por exemplo avaliação de citotoxicidade. Uma vez que estes compostos, apresentam uma grande quantidade de substâncias que podem ser tóxicos e possíveis problemas de instabilidade de cor e odor no produto final podem acontecer.

5. CONCLUSÕES

- A temperatura de pirólise que rendeu uma maior porcentagem em líquido pirolenhoso foi de 650 °C, com o valor de 47,39%.
- O pH do líquido apresentou alterações de acordo com a temperatura de pirólise.
- Por meio da análise de FTIR, a temperatura de pirólise não influenciou na composição química do líquido neste estudo.
- A CIM e CBM do líquido pirolenhoso produzido em temperaturas de pirólise a 650 e 750 °C foi de 1% para *E. coli* e *S. aureus*.
- A temperatura de pirólise que não interferiram na atividade antimicrobiana dos líquidos pirolenhosos foram os produzidos nas temperaturas de 650 e 750°C.
- Estes são resultados preliminares e que para eventual aplicação em produtos deve-se levar em consideração que outros estudos ainda são necessários, como por exemplo avaliação de citotoxicidade.

6. REFERÊNCIAS

- ALBANO, M. **Atividade antibacteriana e anti-enterotoxinas de compostos fenólicos sobre bactérias de interesse clínico**. UNESP - Tese de doutorado. 102 f. Botucatu, São Paulo. 2016.
- ALIGIANNIS, N. *et al.* Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of agricultural and food chemistry**, 49(9), 4168–4170. 2001.
- ALMEIDA, R. S. R *et al.* Pyrolygneous liquid produced at different heating rates in pyrolysis of eucalyptus wood. **Modern Concepts & Developments in Agronomy**. v. 2, p. 1- 5, 2018.
- ARAÚJO, E. S. **Potencial antibacteriano e antifúngico do extrato pirolenhoso**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte - Dissertação de mestrado. 45 f. Macaíba - RN. 2018.
- BHATTACHARYA, S.; SAE-TIA, S.; FRIES, B. C. *Candidiasis* and mechanisms of antifungal resistance. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, p. 312, 2020.
- BROOKS, G. F. *et al.* **Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. 26 ed. Porto Alegre. Editora Artmed, 2014.
- CHEN, H. *et al.* A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. **Fuel Process. Technol.** vol 160, p. 196–206, 2017.
- CHENG, J *et al.* The effects of pyrolysis temperature and storage time on the compositions. **Industrial Crops & Products**. 161, 113226, 2021.
- CHIAMENTI, L. *et al.* Ação antibacteriana do licor pirolenhoso sobre coliformes. **Revista Conhecimento Online**, a. 8, v. 2, p. 47-54. 2016
- CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute. **Method for antifungal disc diffusion susceptibility testing of yeast**. Approved Guideline, M44-A2, 2nd ed., 2020.
- CONCEIÇÃO. C. F. *et al.* **Atividade antimicrobiana do kefir sobre as bactérias gram positivas, gram negativas e fungos leveduriformes**. Trabalho de conclusão de curso – Biomedicina. p. 9. 2018.

COSTA, R. L. **Estudo da decomposição lignocelulósica da biomassa nos processos de pirólise e gaseificação**. Universidade Federal de Santa Catarina. Tese de Doutorado. 121 f, Florianópolis, 2019.

COX, S. D *et al.* The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea lftree oil). **Journal of Applied Microbiology**, 88(1), 170–175. 2001.

DABROS, T. M. H. *et al.* Transportation fuels from biomass fast pyrolysis, catalytic hydrodeoxygenation, and catalytic fast hydrolysis. **Progress in Energy and Combustion Science**, Vol 68, 2018.

DE MEDEIROS, A. J. D. **Aspectos tecnológicos e sociais do potencial antimicrobiano de plantas do semiárido sobre cepas bacterianas isoladas de caprinos**. Universidade Federal Rural do Semi-Árido - Dissertação de Mestrado. 107 f. Mossoró - RN. 2013.

DENAMUR, E. *et al.* The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**. vol 19, p. 37–54. 2021.

DIAS JÚNIOR, A. F. *et al.* Investigating the pyrolysis temperature to define the use of charcoal. **European Journal Of Wood And Wood Products**, [S.L.], v. 78, n. 1, p. 193-204, 2020.

EPE [Empresa de Pesquisa Energética]. **Balço Energético Nacional (BEN) 2021: Ano base 2020**. Disponível em < <https://ben.epe.gov.br> >. Acesso em dez 21.

FANIN, M. *et al.* Métodos alternativos no tratamento de infecções causados por *Staphylococcus aureus*. **Medicina Veterinária Preventiva**. v. 14, n. 1, 2020.

FERNANDES, M. J. *et al.* **Potencial antimicrobiano do extrato pirolenhoso de eucalipto**. 59º Congresso Brasileiro de Química. Disponível em: <http://www.abq.org.br/cbq/2019/trabalhos/5/722-27723.html>. 2019.

FERNANDES, K. M. *et al.* Avaliação da atividade de antimicrobianos comumente utilizados na rede hospitalar de Manaus frente a patógenos humanos. **Brazilian Journal of Development**, vol 7, n. 2, p. 19932-19952, 2021.

FIGUEROA, M. J. M.; MORAES, P. D. Comportamento da madeira a temperaturas elevadas. **Ambiente Construído**. v. 9, n. 4, pp. 157-174. 2021.

GREWAL, A. *et al.* Production, prospects and potential application of pyrolygneous acid in agriculture. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**. v. 135, p. 152-159, 2018.

JANKOWSKY, L. **Avaliação do potencial antimicrobiano do licor pirolenhoso de *Dendrocalamus asper* (Schult & Schult) Backer**. Universidade de São Paulo. Tese de Doutorado – 126p. Piracicaba – São Paulo, 2019.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews, Microbiology**, v. 2, p.123-140, 2005.

LOO, A. **Isolation and characterization of antioxidant compounds from pyrolygneous acid of *Rhizophora apiculata***. Ph.D Thesis, Universiti Sains Malaysia, 2008.

MAEKAWA, K. **Curso sobre produção de carvão, extrato pirolenhoso e seu uso na agricultura**. 2002.

MAITY, S. K. Opportunities, recent trends and challenges of integrated biorefinery:Part II. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 43, 1446-1466. 2015.

MAIA-ARAÚJO, Y. L. F. *et al.* Comparação entre duas técnicas utilizadas no teste de sensibilidade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. **Scientia Plena**. vol 7, n. 4, 2011.

MARUMOTO, S. *et al.* Identification of a germicidal compound against picornavirus in bamboo pyrolygneous acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 60(36):9106–9111, 2012.

MEDEIROS, L. C. D. *et al.* Effect of pyrolysis heating rate on the chemical composition of wood vinegar from *Eucalyptus urograndis* and *Mimosa tenuiflora*. **Revista Árvore**, v. 43, n. 4, p. 408-430, 2019.

MESA, J. M. *et al.* Pirólise rápida em leito fluidilizado: uma opção para transformar biomassa em energia limpa. **Revista Analytica**. n.4, p. 32-36, 2003.

MUELLER, M.; TAINTER, C. R. *Escherichia Coli*. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): **StatPearls Publishing**; 2021 Jan. Acesso dez 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564298/>.

NEGAHDAR, L. *et al.* Characterization and comparison of fast pyrolysis bio-oils from pinewood, rapeseed cake, and wheat straw using ^{13}C NMR and comprehensive GC X GC. **ACS Sustainable Chemistry Engineering**; vol 4, p. 4974–85, 2016.

NEVILLE, B. A.; D'ENFERT, C.; BOUGNOUX, M. *Candida albicans* commensalism in the gastrointestinal tract. **FEMS yeast research**, v. 15, n. 7, p. fov081, 2015.

OTROSKY, E. A. *et al.* Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 18(2): 301-307, 2008.

PEDRAZZI, C *et al.* **Química da madeira**. 1ª edição. Santa Maria. 69 f. Universidade Federal de Santa Maria, 2020.

PARADELA, F. M. R. **Estudo da pirólise de misturas de resíduos de plásticos, pneus e biomassa**. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) - Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2012.

PATWARDHAN, P. R. *et al.* Product distribution from fast pyrolysis of hemicellulose. In: **AIChE Conference**, Nashville, Tennessee, 2009.

PATWARDHAN, P. R. *et al.* Distinguishing primary and secondary reactions of cellulose pyrolysis. **Bioresource Technology**. vol 102, p. 5265-5269, 2011.

PEREZ, M.; PECHA, B. Pyrolysis of lignocellulosic biomass: oil, char, and gas, in: A. Dahiya (Ed.), **Bioenergy**, Elsevier, Inc, p. 413–442, 2015.

PERKINS, G. *et al.* Process development status of fast pyrolysis technologies for the manufacture of renewable transport fuels from biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. p. 292-315, 2018.

PEREIRA, R. *et al.* Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. **Journal of Applied Microbiology**. vol 131, p. 11-22, 2020.

PIMENTA, A. *et al.* Chemical composition of pyroligneous acid obtained from *Eucalyptus* GG100 clone. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 426, 2018.

PORTO, F. G. S *et al.* Distilled pyroligneous liquor obtained from *Eucalyptus grandis* and chitosan: physicochemical properties of the solution and films. **Environmental Science and Pollution Research**. vol 26, p. 672-683, 2019.

RUDD, K. E. *et al.* Incidência e mortalidade global, regional e nacional de sepse, 1990-2017: análise para o Global Burden of Disease Study. **Lancet (Londres, Inglaterra)**. vol. 395, p. 200-211, 2020.

SILVA, C. V. **Caracterização do bio-óleo produzido por pirólise rápida do bagaço de cana-de-açúcar**. Universidade Federal de Uberlândia. Dissertação de Mestrado. 90 f, Uberlândia, 2013.

SILVA, V. L. **“Morfologia, citologia e fisiologia bacteriana - enfermagem”**. [Apostila de sala de aula]. Professora Vânia Lúcia da Silva. Universidade Federal de Juiz de Fora. 2013.

SOARES, W. **Extrato pirolenhoso de jurema preta e eucalipto como antissépticos alternativos no pós-dipping de cabras leiteiras**. Tese – Doutorado. 84 f. Mossoró, Rio Grande do Norte, 2020.

SOARES *et al.* Candidíase vulvovagina: uma revisão de literatura com abordagem para *Candida albicans*. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**. vol. 25, n.1, p. 28-34, 2019.

SOUZA, J. L. S. *et al.* Antimicrobial potential of pyrolygneous extracts – a systematic review and technological prospecting. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 49, n. 1, p. 128-139, 2018.

SURESH, G. *et al.* In vitro evaluation of antimicrobial efficacy of pyrolygneous acid from softwood mixture. **Biotechnology Research and Innovation**. Volume 3, Issue 1, pag. 47-53, 2019.

TANABE, J. M. **Efeito do aspartato sobre o crescimento e formação de biofilmes por *Staphylococcus aureus***. Trabalho de conclusão de curso - Universidade Federal de São Carlos. 49 f. Buri - São Paulo, 2021.

TANAKA, S.; KAHMANN, R. Cell wall-associated effectors of plant-colonizing fungi. **Mycologia**, 113:2, 247-260, 2021.

TAYLOR, T. A, UNAKAL, C. G. *Staphylococcus Aureus*. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): **StatPearls Publishing**; 2021 Jan. Acesso em dez 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>.

TRINDADE, L. A. **Avaliação da atividade biológica do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) Rendele e do fitoconstituente citronelal sobre *Candida albicans*.** Tese de Doutorado - Universidade Federal de Pernambuco. 51 f. Recife. 2021.

TRINH, T. N. *et al.* Comparison of lignina, macroalgae, wood, and straw fast pyrolysis. **Energy fuels.** vol 27, p. 1399-1409. 2013.

VIEIRA, W. T. **Caracterização cromatográfica e avaliação da atividade antimicrobiana do extrato pirolenhoso obtido a partir de biomassas residuais.** 140 f. Dissertações (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2019.

WANG, Z. *et al.* Effect of cellulose crystallinity on the formation of a liquid intermediate and on product distribution during pyrolysis. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis.** vol 100, p. 56-66, 2013.

ZHOU, S. *et al.* Secondary vapor phase reactions of lignin-derived oligomers obtained by fast pyrolysis of pine wood. **Energy & Fuels,** p. 1428-1438, 2013.