



CAROLINA DE CASTRO BUENO

BIOCHAR:

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E INTERAÇÕES COM NUTRIENTES E
MICROORGANISMOS PEDOLÓGICOS**

Sorocaba

2017

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em

ciências  **unesp**
ambientais Sorocaba

CAROLINA DE CASTRO BUENO

BIOCHAR:

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E INTERAÇÕES COM NUTRIENTES E
MICROORGANISMOS PEDOLÓGICOS**

Tese de doutorado apresentada como requisito
para a obtenção do título de Doutor em Ciências
Ambientais da Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho" na Área Recuperação
Ambiental

Orientador: Prof. Dr. André Henrique Rosa

Sorocaba

2017

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em

ciências ambientais



unesp
Sorocaba

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Unesp
Instituto de Ciência e Tecnologia – Câmpus de Sorocaba

Bueno, Carolina de Castro.

Biochar: caracterização estrutural e interações com nutrientes e microorganismos pedológicos / Carolina de Castro Bueno, 2017. 158 f.: il.

Orientador: André Henrique Rosa.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Ciência e Tecnologia (Câmpus de Sorocaba), 2017.

1. Biocarvão. 2. Toxicidade aguda. 3. Microorganismos do solo. 4. Germinação. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Ciência e Tecnologia (Câmpus de Sorocaba). II. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Sorocaba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Biochar: caracterização estrutural e interações com nutrientes e microorganismos pedológicos

AUTORA: CAROLINA DE CASTRO BUENO

ORIENTADOR: ANDRÉ HENRIQUE ROSA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS AMBIENTAIS, área: Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ANDRÉ HENRIQUE ROSA
Departamento de Engenharia Ambiental / Instituto de Ciência e Tecnologia - UNESP – Sorocaba

Prof. Dr. LEANDRO CARDOSO DE MORAIS
Ciências Ambientais / UNESP Sorocaba

Prof. Dr. ADMILSON IRÍIO RIBEIRO
Engenharia Ambiental - ICTS/ UNESP / UNESP-Sorocaba

Prof. Dr. WILSON TADEU LOPES DA SILVA
Instrumentação Agropecuária / Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / EMBRAPA / São Carlos

Prof. Dr. RENATO GRILLO
Departamento de Física e Química / UNESP- Ilha Solteira

Sorocaba, 04 de setembro de 2017

Aos meus pais Francisco e Clarice,

À minha irmã Camila e meu cunhado Fabrício

Aos meus avós Cesário e Berenice

À Maria

Ao meu amor Vinícius

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família pelo amor incondicional. À minha segunda família Chico, Suzi e Léo e a todos da família Panebianchi por sempre estarem ao meu lado. Agradeço ao meu melhor amigo e amor Vinícius pelo apoio e amor incondicional durante todos esses anos.

Agradeço ao meu orientador Dr. André Henrique Rosa pelo voto de confiança, por todos os ensinamentos transmitidos e por ajudar a construir minha carreira acadêmica e desenvolvimento pessoal.

Agradeço à Elisabetta Loffredo e meus colegas Eren Taskin e Hana Voca por tornarem meus dias alegres e por todo ensinamento que me transmitiram na Università degli Studi di Bari Aldo Moro. Agradeço à Rita, Roberto e Bianca Rita por terem dado todo suporte e apoio incondicional para meu estágio ter acontecido com sucesso.

Agradeço aos meus amigos que tornaram os dias memoráveis. Agradeço aos colegas de laboratório, técnicos dos laboratórios da UNESP e a todos os funcionários da biblioteca por completarem meus dias com sorrisos. Agradeço aos colegas do LNNANO por todo apoio. A contribuição de todos vocês foi essencial para a realização deste trabalho.

Agradeço a todos meus orientadores ao longo de minha carreira que contribuíram e me ajudaram a trilhar o caminho até esta etapa. Agradeço ao Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto e ao Prof. Dr. Paulo Pinheiro por todo apoio no período do doutorado.

Agradeço ao Parque Tecnológico de Sorocaba e à UNESP pelo apoio e infraestrutura.

Agradeço à Dra. Elidiane Rangel e Dr. Nilson Cruz pelo apoio científico e experimental e por todos do LaPTec por todo apoio quando precisei.

Agradeço ao Dr. David Mendez Soares e ao amigo Luiz Bonugli pelo apoio experimental nas instalações do Laboratório de Nanoestruturas e Interfaces do Instituto de Física "Gleb Wataghin" da Universidade Estadual de Campinas.

Agradeço ao Prof. Dr. Itamar Soares de Melo por ceder cepas das bactérias utilizadas neste trabalho e agradeço a André Fattobene, Verônica Mello e ao Prof. Dr. Arnaldo Antonio Rodella pelas amostras de fósforo de rocha cedidas.

Agradeço à D'us por ter me guiado por este caminho e por estar sempre presente em minha vida. Que Sua Luz possa alcançar a todos que me ajudaram na construção de minha vida pessoal e profissional.

À FAPESP pelo apoio financeiro e bolsa de doutorado - Número do Processo: 2013/08373-0.

Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto.

Carl Sagan

Bueno, C. C. *Biochar: Caracterização Estrutural e Interações com Nutrientes e Microorganismos Pedológicos*. [tese final]. Sorocaba (SP): Pós-Graduação em Ciências Ambientais, UNESP - Universidade Estadual Paulista; 2017.

RESUMO

Todo produto agrícola interfere na situação termodinâmica de solos, afetando as interações entre solo-microorganismos-plantas. *Biochar* é definido como um material carbonáceo multifuncional que atua como condicionante/ fertilizante e eleva a qualidade de solos. Pode estar presente naturalmente em solos férteis ou produzido a partir da pirólise de resíduos agrícolas gerando produtos de maior valor agregado. A literatura destaca casos de sucesso de sua aplicação no solo e como material adsorvente de contaminantes orgânicos e inorgânicos. No entanto, poucas informações estão disponíveis sobre possíveis efeitos antagônicos do *biochar* aos microorganismos do solo e alterações diretas no desenvolvimento de plântulas. Visando entender interações do *biochar* no sistema solo-microorganismos-plantas, este trabalho objetivou identificar os efeitos de diferentes doses de *biochar* produzidos a partir de bagaço de cana-de-açúcar e palha de sabugo de milho na interação com nutrientes, desenvolvimento de fungos ligninolíticos, bactérias promotoras do crescimento de plantas e de plântulas de milho. Para tanto, as amostras de *biochar* foram produzidas por meio de pirólise em nove regimes de temperatura para compreender quais mudanças morfológicas e físico-químicas ocorrem na formação do *biochar*. Com o objetivo de preservar as interações multitróficas do solo, foram explorados os efeitos de diferentes doses de *biochar* no crescimento radial de micélios três diferentes espécies de fungos ligninolíticos: *Bjerkandera adusta*, *Pleurotus ostreatus* e *Trametes versicolor*. Foi encontrado um efeito dependente da espécie, onde as mesmas amostras de *biochar* podem causar toxicidade aguda e efeito aditivo no crescimento desses fungos. A espécie *T. versicolor* mostrou ser a espécie mais adaptada. Da mesma forma, as bactérias das espécies *Bacillus aryabhattai* (CMAA-1363) e *Leocobacter sp* (CMAA-1422) foram incubadas em meios de cultivo contendo *biochar* em diferentes doses. Foram verificadas que ambas as espécies não sobreviveram à incubação direta, liberando no processo exsudados (biopolímero) higroscópicos no meio. Experimentos de germinação de sementes de milho mostraram que apenas as baixas doses de *biochar* produzidos a partir de bagaço de cana-de-açúcar nas temperaturas de 400 e 600 °C apresentaram efeitos aditivos ao desenvolvimento das plântulas. Quando os exsudatos bacterianos foram testados como fertilizante líquido, apenas o *biochar* produzido de palha de milho a 300 °C graus e em baixa dose apresentou efeitos aditivos no crescimento das plântulas. Assim, este trabalho aponta a necessidade de estudos específicos e multitróficos de materiais destinados ao sistema pedológico.

Palavras-chave: *biochar*; toxicidade; microorganismos pedológicos; germinação

Bueno, C. C. *Biochar: Structural Characterization and Interactions with Nutrients and Pedological Microorganisms*. [tese final]. Sorocaba (SP): Pós-Graduação em Ciências Ambientais, UNESP - Universidade Estadual Paulista; 2017.

ABSTRACT

Any agricultural product that reaches the pedological system interferes in the thermodynamic situation of soil non-equilibrium, affecting the soil-microorganisms-plants set. In recent years, *biochar* has been identified as a conditioning / fertilizing material that helps raise the soil qualities. *Biochar* is a multifunctional carbonaceous material already existing naturally in fertile soils. However, the non-natural production of *biochar* has been considered as an alternative destination to agricultural waste that generates value-added products. The literature highlights successful cases of its application in the soil and as adsorbent material of organic and inorganic contaminants. However, little information is available on possible antagonistic effects of *biochar* on soil microorganisms and direct changes in seedling development. In order to understand possible points of bifurcations that *biochar* can generate in the soil-microorganisms-plants system, this work aimed to identify the effects of different doses of *biochar* produced from sugarcane bagasse and corn cob in the growth and development of ligninolytic fungi, plant growth promoting bacteria and maize seedlings. For this, the *biochar* samples were produced by means of pyrolysis in nine temperature regimes to understand which morphological and physicochemical changes occur in the formation of *biochar*. With the objective of preserving the soil multitrophic interactions, it was explored the effects of different doses of *biochar* on the radial growth of mycelium three different species of ligninolytic fungi: *Bjerkandera adusta*, *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor*. A species-dependent effect was found where the same *biochar* samples can cause acute toxicity and additive effect on the growth of these fungi. The species *T. versicolor* showed to be the most adapted species. Similarly, bacteria of the species *Bacillus aryabhattai* (CMAA-1363) and *Leocobacter sp* (CMAA-1422) were incubated in culture media containing *biochar* at different doses. It was verified that both species did not survive the direct incubation, releasing hygroscopic exudates (biopolymer) in the medium. Germination experiments of corn seeds showed that only the low doses of *biochar* produced from sugarcane bagasse at temperatures of 400 and 600°C had additive effects to the development of the seedlings. When the bacterial exudates were tested as liquid fertilizer, only the *biochar* produced from corn straw at 300 degrees and at low dose had additive effects on the growth of the seedlings. Thus, this work points out the need for specific and multitrophic studies of materials destined to the pedological system.

Keywords: *biochar*, toxicity, pedological microorganisms; germination

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	14
CAPÍTULO I	16
CARACTERIZAÇÃO DO BIOCHAR PARA SUA ADEQUADA UTILIZAÇÃO COMO MATERIAL CONDICIONANTE DE SOLOS	16
RESUMO	16
1 INTRODUÇÃO	16
2 MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.1 MATERIAIS E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	19
2.2 ESPECIFICAÇÕES DO FORNO MUFLA E CONDIÇÕES DE PIRÓLISE	21
2.3 RENDIMENTO DA PIRÓLISE	22
2.3.1 <i>Análise de cor</i>	22
2.4 POTENCIAL HIDROGENIÔNICO	22
2.4.1 <i>Grupos funcionais superficiais - Método de Boehm</i>	23
2.5 CARBONO ORGÂNICO DISSOLVIDO	24
2.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA	24
2.7 ESPECTROS DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER E ESPECTROSCOPIA RAMAN	25
2.8 ANÁLISE DE MOLHABILIDADE/ REPELÊNCIA DE ÁGUA	26
2.9 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR – RMN ¹³ C	26
2.10 ANÁLISE BET – ÁREA SUPERFICIAL	27
2.11 DIFRATÔMETRO DE RAIOS-X	27
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
3.1. RENDIMENTO DA PIRÓLISE	28
3.2 pH	30
3.2.1 <i>Grupos funcionais superficiais - Método de Boehm</i>	32
3.3 CARBONO ORGÂNICO DISSOLVIDO	33
3.4 MEV E EDS	35
3.5 FTIR E RAMAN	41
3.6 ANÁLISE DE MOLHABILIDADE	50
3.7 RMN ¹³ C	55
3.8 ÁREA SUPERFICIAL – BET	61
3.9 DIFRATÔMETRO DE RAIOS-X	63
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
CAPÍTULO II	71

VIABILIDADE MICROBIOLÓGICA: INTERAÇÃO ENTRE BIOCHARS E MICROORGANISMOS PEDOLÓGICOS	71
RESUMO.....	71
1 INTRODUÇÃO	71
1.1 BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS	72
1.2 FUNGOS LIGNINOLÍTICOS	73
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	73
2.1 MICROBIOLOGIA – BACTÉRIAS.....	74
2.1.1 <i>Preparação da suspensão bacteriana para incorporação no sistema biochar</i>	<i>74</i>
2.1.2 <i>Biochar como um substrato para a BPCPs: Inoculação</i>	<i>75</i>
2.1.4 <i>Microscopia de Força Atômica com mapeamento químico por infravermelho.....</i>	<i>75</i>
2.2 MICROBIOLOGIA – FUNGOS	76
2.2.1 <i>Experimentos de crescimento</i>	<i>76</i>
2.2.2 <i>Ensaio sobre o crescimento micelial.....</i>	<i>76</i>
2.2.3 <i>Análises Estatísticas</i>	<i>77</i>
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
3.1. BACTÉRIAS	78
3.1.1 <i>AFM com mapeamento químico por infravermelho</i>	<i>81</i>
3.2. FUNGOS	85
3.2.1 <i>Efeito do biochar sobre o crescimento micelial radial</i>	<i>86</i>
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
CAPÍTULO III.....	100
A INFLUÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DE BIOCHAR, ESFERAS POLIMÉRICAS DE BIOCHAR E NUTRIENTES NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE SEMENTES DE MILHO	100
RESUMO.....	100
1. INTRODUÇÃO	101
1.1 ESTUDOS DE GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES NA PRESENÇA DE BIOCHAR.....	101
1.2 ENCAPSULAÇÃO: ALGINATO DE SÓDIO	102
1.2.1 <i>Encapsulamento via aprisionamento em gel</i>	<i>103</i>
1.3 PRINCÍPIO NUTRITIVO: FOSFATO DE ROCHA	104
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	104
2.1 PRODUÇÃO DAS ESFERAS DE ALGINATO	104
2.1.1 <i>Influência do meio iônico de reticulação na liberação de fósforo em esferas.....</i>	<i>105</i>
2.1.2 <i>Estabilidade das esferas</i>	<i>107</i>
2.2 TESTE DE GERMINAÇÃO.....	108
2.2.1 <i>Análise e escolha do substrato.....</i>	<i>108</i>
2.2.2 <i>Preparo do substrato e enchimento dos recipientes de semeadura</i>	<i>110</i>
2.2.3 <i>Modo de aplicação do fertilizante e semeadura das sementes de milho.....</i>	<i>111</i>

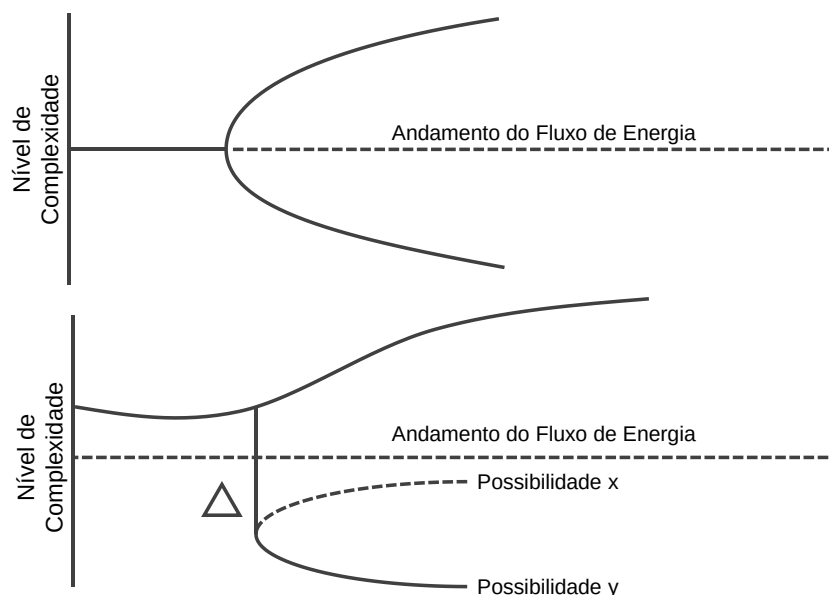
2.2.4 Ensaio de desenvolvimento das sementes de milho	111
2.2.5 Análises estatísticas	113
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	114
3.1 PRODUÇÃO DE ESFERAS DE ALGINATO	114
3.2 LIBERAÇÃO DE NUTRIENTES PRESENTES NO FÓSFORO DE ROCHA	117
3.4 TESTES DE GERMINAÇÃO.....	120
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	140
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141

APRESENTAÇÃO

A agricultura que produz os alimentos é nutrida pela qualidade pedológica na qual está inserida. O solo é um sistema aberto que recebe um fluxo contínuo de energia e matéria (Vezzani e Mielniczuk, 2011). Ou seja, o ambiente pedológico está condicionado a funcionar de acordo com o fluxo que recebe. Neste contexto, pode-se inferir que todo material condicionante, fertilizante, agroquímico, etc. inserido no sistema de cultivo interfere a curto, médio ou em longo prazo na situação termodinâmica de não equilíbrio dos solos.

Comumente, algum fluxo inserido no sistema faz com que o solo aumente seu nível de complexidade. Esses momentos são definidos como sendo pontos de bifurcação, como aponta Vezzani e Mielniczuk (2011). Nesses pontos de bifurcação o desempenho do sistema aberto pode evoluir na direção de vários níveis de complexidade, sejam de impactos positivos ou negativos, como mostra a Figura 1.

Figura 1 – Diferentes possibilidades de estados de ordem em um sistema termodinâmico em condição de não equilíbrio. Linha contínua define estados estáveis de ordem; Linha tracejada define estados de instabilidade; Δ define a separação entre ramos perturbados (pontos de bifurcação).



Fonte: Adaptado de Vezzani e Mielniczuk (2011)

Os diversos materiais agrícolas existentes atualmente carecem de análises que encontrem e determinem possibilidades de formação desses pontos de bifurcação que possam

interferir de forma deletéria no andamento de fluxo de energia e matéria pedológica no conjunto solo-microorganismos-plantas.

Um dos materiais agrícolas que tem atraído à atenção de pesquisadores, agricultores e agências ambientais é o *biochar*. O *biochar* é conhecido como um material carbonáceo multifuncional utilizado principalmente em agrossistemas. A literatura destaca casos de sucesso de sua aplicação no solo e como material adsorvente de contaminantes orgânicos e inorgânicos. No entanto, poucas informações estão disponíveis sobre possíveis efeitos antagônicos, toxicológicos e negativos do *biochar* em microorganismos do solo e alterações diretas no desenvolvimento de plântulas. Portanto, averiguar se o *biochar* é passível de perturbar o sistema solo-planta-microorganismos e criar possíveis impactos positivos ou negativos é importante. Neste sentido, este trabalho explorou os efeitos de diferentes doses de *biochar* produzidos a partir de bagaço de cana-de-açúcar e palha de sabugo de milho no crescimento e desenvolvimento de fungos ligninolíticos, bactérias promotoras do crescimento de plantas e de plântulas de milho.

Desta forma, o Capítulo I apresenta o *biochar* como um insumo agrícola e, portanto, é submetido a diversas caracterizações morfológicas e físico-químicas. No Capítulo II são abordados os efeitos das interações *biochar*-fungos e *biochar*-bactérias. Já no Capítulo III discute-se qual a influência direta da aplicação de *biochar* e fósforo de rocha na germinação de sementes de milho. Todo o trabalho destaca a necessidade de estudos específicos e multitróficos de materiais destinados ao sistema pedológico.

CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO DO *BIOCHAR* PARA SUA ADEQUADA UTILIZAÇÃO COMO MATERIAL CONDICIONANTE DE SOLOS

RESUMO

Diversas caracterizações físico-químicas, análises e entendimento que as características de produção e biomassa de origem exercem nos *biochars* são cruciais para a aceitação e uso deste material como insumo agrícola seguro. Enquanto muitos estudos surgem indicando impactos positivos dos *biochars* no crescimento e desenvolvimento de plantas, poucos ainda relatam seus impactos no sistema do solo de forma holística. Ao modificar a biomassa de origem e modo de produção via pirólise, como temperatura e tempo de residência, diferentes tipos de *biochar* podem ser produzidos, como diversas características físico-químicas. Logo, a padronização de utilização deste material carbonáceo, bem como os efeitos esperados quando utilizado no solo se tornam difíceis de prever. Isto porque além de melhorar as propriedades físicas e químicas do solo, os *biochars* podem conter compostos tóxicos para microorganismos e plantas, tornando seu uso seguro no ambiente somente após uma investigação de suas características intrínsecas e bem definidas. Neste contexto, este capítulo visa apresentar as caracterizações de *biochars* produzidos a partir de duas biomassas diferentes, palha do sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar, em nove regimes de temperatura de pirólise diferentes (250 a 800 °C). O objetivo principal deste tipo de análise é criar embasamentos para entender a origem da expressão dos efeitos dos *biochars* quando promovida a interação dessas amostras com microorganismos pedológicos e sementes de milho. Foi encontrado, principalmente, que as características do processo de produção afetam diretamente nas cargas superficiais, estabilidade e distribuição das porções de carbono, porosidade, tamanho da área de superfície interna e externa, teor e disponibilidade de nutrientes presentes nos *biochars* produzidos. Finalmente, a biomassa de origem provou ser a principal fonte de modificações nas características dos *biochars*, visto que a temperatura de pirólise as afetam até um patamar (~600 °C).

Palavras-chave: *biochar*, palha de sabugo de milho, bagaço de cana-de-açúcar, caracterização físico-química

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o aumento de detritos orgânicos ao redor do mundo tem sido registrado. Por causa disso, o interesse na utilização de resíduos orgânicos agrícolas, urbanos e industriais como produtos de valor agregado possui amplo potencial e necessita ser explorado de forma multidisciplinar. Esses resíduos são denominados de biomassa, que é

considerada uma fonte de energia renovável e é definida como sendo toda a matéria orgânica derivada de plantas, animais e produtos do processamento natural. Esta definição é especialmente relacionada a resíduos advindos de atividades agrícolas, pecuária e floresta, além de subprodutos das indústrias de processamento de alimentos e madeira (Adrados *et al.*, 2013). Os recursos derivados da biomassa são utilizados indevidamente, como mostra a realidade chinesa, por exemplo, onde existe uma estimativa de que 23% dos resíduos de culturas (biomassa) sejam utilizados como forragem, 4% destinados para materiais industriais, 0,5% para a produção de biogás (onde grande parte é utilizada com pouca eficiência ou desperdiçada), 37% é queimado direta e indiscriminadamente, 15% são perdidos durante a colheita e, por fim, 20,5% são descartados (Liu *et al.*, 2008).

Dessa forma, é viável e recomendável que se utilize tais resíduos orgânicos de forma mais eficiente de modo que possam ser inseridos no ciclo dos sistemas de produção agrícola, tornando-as sustentáveis e eficientes. Uma possibilidade de transformação desses rejeitos em produtos de valores agregados e destinados a serviços ambientais, é a conversão termoquímica. A conversão termoquímica, também conhecida como pirólise, é uma ferramenta para a transformação de resíduos orgânicos e está sendo consolidada globalmente como uma tecnologia economicamente viável para reaproveitamento total de resíduos agrícolas, visto que são produzidos três principais produtos de interesse comercial: carvão sólido, bio óleo e gás de síntese (*syngas*) (Chen *et al.*, 2012). A pirólise é uma alternativa promissora para a destinação de resíduos para convertê-los em produtos sólidos, líquidos e gasosos, com maior vantagem de transporte, armazenamento, manuseio, pois reduz o volume e massa dos resíduos (Brown, 2010) readaptação e flexibilidade na produção e comercialização (Putun *et al.*, 2004; Cantrell *et al.*, 2012). A pirólise também apresenta a vantagem de eliminar agentes patogênicos por intermédio das altas temperaturas utilizadas ($>350^{\circ}\text{C}$) (Lehmann e Joseph, 2010; Ro *et al.*, 2010).

Estudos específicos sobre a conversão de resíduos agrícolas em energia e produtos químicos com alto valor agregado por meio da pirólise também são muito promissores para futuras aplicações como materiais condicionantes de solo, adsorventes de baixo custo para a remoção de contaminantes do ambiente e briquetes para a produção de energia (Oasmaa *et al.*, 2003; Zhurinsh *et al.*, 2005). Por conta desses fatos, a pirólise hoje é vista como sendo uma tecnologia termoquímica promissora para destinação de resíduos, aproveitamento de biomassa e conversão de biomassa em combustíveis de energia densa (Putun *et al.*, 2007; Carrier *et al.*, 2012).

O produto sólido gerado dentro do processo de pirólise é um resíduo carbonáceo e incombusto denominado de *char* (Uden, 1993; Machado *et al.*, 2011). Logo, o *biochar* é um material sólido rico em carbono produzido pela decomposição térmica da matéria orgânica/biomassa (Brownsort *et al.*, 2011), sendo também uma forma estável de carbono de resíduos orgânicos (Schmidt, 2012). O *biochar* também é conhecido como carbono pirogênico (Preston e Schmidt, 2006).

Nos últimos anos, os *biochars* têm despertado muita atenção em aplicações ambientais e agrícolas como materiais ecológicos eficientes e versáteis (Zhao *et al.*, 2013). O *biochar* é um material multifuncional que é empregado, principalmente, como um condicionante de solo para imobilizar metais, aumentar a resistência pedológica à seca, para fertilizar e recuperar solos, sobretudo por intermédio do aumento do pH do solo (Schmidt, 2012), principalmente devido à sua elevada capacidade de retenção de água (Vartapetyan e Voloshchuk, 1995; Ogawa *et al.*, 2006). Dependendo da biomassa de origem o *biochar* pode ser fonte de nutrientes, como fósforo, cálcio e manganês, sendo que em alguns casos diminui a mineralização de nitrogênio no solo (Uchimiya *et al.*, 2010; Aguilar-Chavez *et al.*, 2012; Ahmad, Lee, Dou, *et al.*, 2012; Ahmad, Lee, Yang, *et al.*, 2012; Al-Wabel *et al.*, 2013; Antonio Albuquerque *et al.*, 2013; Dai *et al.*, 2013). Sabe-se também que uma vez aplicado ao solo, o *biochar* é capaz de aumentar o rendimento das culturas (Abiven *et al.*, 2014), bem como capaz de desdobrar plenamente a sua função como reserva de nutrientes e estabilizadores húmus, por intermédio da criação de complexos *char-argila-húmus* (Schmidt, 2012).

Sendo o *biochar* resistente à degradação microbiológica por conter carbono orgânico recalcitrante (Major, Julie *et al.*, 2010; Al-Wabel *et al.*, 2013), suas características são preservadas nos sistemas terrestres por muito mais tempo do que, por exemplo, os resíduos de plantas ou de compostos orgânicos, estendendo seus benefícios ao longo do tempo (Figura 3) (Major, J. *et al.*, 2010; Fabbri *et al.*, 2012; Bai *et al.*, 2013). Por esse mesmo motivo, do ponto de vista ambiental, o *biochar* também é útil no armazenamento e sequestro de carbono para o solo (Lehmann *et al.*, 2006; Gaunt e Lehmann, 2008; Laird, 2008; Abiven *et al.*, 2014)

Entretanto, apesar de todos esses benefícios citados, em um dado local, a aplicação de diferentes tipos de *biochar* pode levar a respostas muito diferentes, podendo ser benéficas ou maléficas. Atualmente, já se conhece que o *biochar* não é universalmente benéfico para diferentes tipos de cultura e/ ou microorganismos, como frequentemente assumido. Desta forma, os resultados de sua aplicação podem variar muito, dependendo das circunstâncias agrícolas e climáticas (Abiven *et al.*, 2014), como mostra, por exemplo, estudos de inibição

do crescimento de batata (Hansen, 2016) e pepino (Jaiswal *et al.*, 2014) na presença de *biochar*, supressão de diferentes espécies de microorganismos pedológicos (Budai *et al.*, 2016), bem como a interrupção de comunicação molecular entre células levando a supressão da comunicação microbiana no solo (Masiello *et al.*, 2013).

Nesse sentido, cada material inserido no sistema pedológico tem um efeito independente sobre o crescimento de uma população de microorganismos ou plantas. Ou seja, um material aplicado como condicionante de solo, como o *biochar*, por exemplo, pode determinar o crescimento de espécies nativas, seja pelo aumento ou supressão de compostos importantes para desenvolvimento e equilíbrio do sistema do solo e assim, determinar se essas mudanças serão eficazes e favoráveis à fitoestabilização de culturas agrícolas. Neste contexto, este capítulo tem por objetivo caracterizar química e fisicamente os diferentes tipos de *biochars* produzidos a partir de resíduos agrícolas de bagaço de cana-de-açúcar e palha de sabugo de milho e, assim, que possam ser identificadas e delineadas quais características do material são importantes conhecer para a sua utilização como condicionante de solo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais e preparação das amostras

Os resíduos de palha de milho e bagaço de cana-de-açúcar utilizados para a fabricação de *biochar* foram separados e acondicionados em baías de madeira para secagem natural prévia por 7 dias (Figura 2). Após esse período foram recolhidos e lavados em água corrente para remoção de poeira e, em seguida, secos em estufa com circulação mecânica de ar por 48 horas à temperatura de 80 °C (Zhao *et al.*, 2013). Posteriormente, os resíduos secos foram trituradas (Figura 3A e B) em um Moinho de Facas tipo Willye (NL-226-02 – New Lab) com rotação fixa de 1730 rpm, visto que o tamanho das partículas de biomassa é um parâmetro significativo para a produção de *biochar*, afetando diretamente o rendimento da pirólise (Demirbas, 2004; 2005) e as amostras passaram a ser designadas pela sigla BMPM (biomassa de palha de milho). O mesmo processo de preparação foi realizado para o bagaço fresco de cana-de-açúcar (Figura 3C e D) e as amostras passaram a ser designadas pela sigla BMCA (biomassa de cana-de-açúcar). É importante destacar que este resíduo antes do processo de lavagem e secagem foi armazenado em frascos fechados para a promoção da fermentação do bagaço por 48 horas. Os resíduos orgânicos utilizados para a fabricação de *biochar* foram triturados previamente à etapa de pirólise, a fim de aumentar a área superficial das partículas,

bem como a quantidade de ligações disponíveis do material (Callister, 2008). Esta questão é particularmente importante na transferência térmica disponível no material e influencia diretamente o rendimento da produção de *biochar*. Após a moagem, a biomassa selecionada para a produção de *biochar* foi peneirada em uma peneira de malha 65 MESH (0,210 mm de abertura) para padronização do material.

Figura 2 – Obtenção e pré-tratamento da biomassa parental de palha de sabugo de milho. (A) Baia utilizada para secagem da biomassa de palha de milho (BMPM) (Período 7 dias); (B) BMPM fresco (dia 1) e; (C) BMPM seco (dia 7).



Fonte: Acervo Pessoal

Figura 3 – Amostras finais de biomassa para a produção de *biochar*. (A) Resíduo de BMPM seco; (B) Resíduo BMPM triturado; (C) Resíduo de BMCA seco e; (D) Resíduo de BMCA triturado.

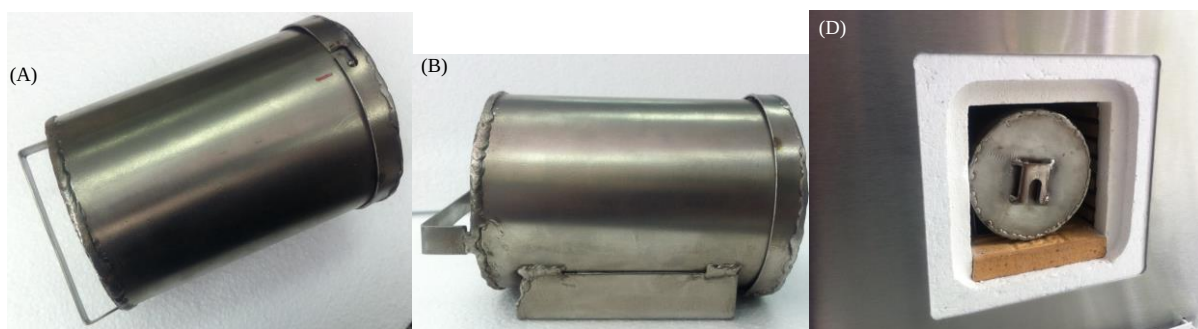


Fonte: Acervo Pessoal

2.2 Especificações do forno mufla e condições de pirólise

A pirólise dos resíduos foi realizada em escala de laboratório por intermédio de um forno mufla modelo 1800 3P (EDG) que opera em regime de trabalho contínuo para atingir a temperatura especificada e possui controlador microprocessado modelo EDGCON-3P para ciclos completos de rampas, patamares e resfriamentos (Figura 4). Os experimentos foram conduzidos em uma atmosfera com baixo teor de oxigênio.

Figura 4 - Reator tubular de aço inoxidável (9,0 cm de diâmetro interno e 12,5 cm de comprimento) para conversão de biomassa para *biochar*, com capacidade volumétrica de 795,2 cm³. (A) Vista superior; (B) Vista lateral e; (C) Reator dentro do forno mufla.



Fonte: Acervo Pessoal

A pirólise das amostras foi realizada para nove diferentes regimes de temperaturas: 250 °C, 300 °C, 400 °C, 450 °C, 500 °C, 550 °C, 600 °C, 700 °C e 800 °C. Assim, os respectivos *biochars* produzidos de BMPM foram designados, respectivamente, de BPM250, BPM300, BPM400, BPM450, BPM500, BPM550, BPM600, BPM700 e BPM800 e os produzidos a partir de BMCA foram designados de BCA250, BCA300, BCA400, BCA450, BCA500, BCA550, BCA600, BCA700 e BCA800. As condições de processamento térmico seguiram um ciclo de pirólise lenta com aumento de 5 °C min⁻¹ (Ben e Ragauskas, 2013). O regime de pirólise lenta foi escolhido como procedimento padrão para este trabalho para produção de *biochar*, pois é sabido que a pirólise lenta normalmente produz 35% de porção sólida (*char*) em comparação com 10% de rendimento para a pirólise rápida (Demirbas, 2004; 2005; Carrier *et al.*, 2012). O tempo de retenção das amostras na temperatura de produção foi de 120 minutos. As amostras foram resfriadas em temperatura ambiente por 12 horas (para prevenir a combustão do *biochar* ao entrar em contato com o oxigênio atmosférico) e, em seguida, as massas foram registradas para cálculo do rendimento de produção do *biochar*.

(Zheng *et al.*, 2010). Posteriormente, as amostras foram armazenadas em frascos de polipropileno devidamente identificados e armazenados em temperatura ambiente até sua utilização.

2.3 Rendimento da pirólise

O rendimento dos produtos pirolisados (R_{BC}) foi calculado a partir da perda de massa calculada por intermédio da massa seca inicial da biomassa de origem (m_B), considerada como 100%) e final da amostra de *biochar* produzido (m_{BC}), conforme a Equação 1.

$$R_{BC}(\%) = 100 \times \left(\frac{m_{BC}}{m_B} \right) \quad (1)$$

Os rendimentos foram expressos com uma média de três regimes de pirólise para a mesma temperatura (n=3). O erro experimental foi de $< \pm 0,5 \%$ em peso.

2.3.1 Análise de cor

As amostras de *biochar* foram classificadas segundo a Escala de Cores Pantone (PMS, do inglês *Pantone Matching System*) por ser um sistema numérico de cores de alta regularidade e padrão. Por meio desta análise, percebe-se visualmente a evolução dos estágios de pirólise, incompleta e completa.

2.4 Potencial hidrogeniônico

O potencial hidrogeniônico (pH) dos diferentes tipos de *biochars* produzidos foi aferido segundo o método padronizado da US Environmental Protection Agency (EPA), número 9045D para medição de pH de solos e resíduos sólidos ((Epa), 2004). Este método consiste na medição do pH por meio de eletrodo combinado imerso em suspensão sólido:líquido (*char*:água ultra pura / solução salina de CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$) na relação 1:2,5 (mL^{-1}). Todas as amostras foram filtradas antes da aferição (Chromafil® Xtra - PTFE-45/25

- 0,45 μm). A determinação do pH em solução salina também foi realizada para contabilizar a influência dos ácidos fracos das amostras (Silva, F. C. *et al.*, 2009).

2.4.1 Grupos funcionais superficiais - Método de Boehm

O método de Boehm é bastante utilizado para determinar a natureza e a quantidade dos grupos com oxigênio das superfícies de carvões de diversas naturezas. A identificação dos grupos funcionais ocorre por meio de técnicas titulométricas. Inicialmente, 0,5 g de cada amostra de *biochar* foram colocadas, separadamente, em 25 mL de solução de hidróxido de sódio (0,1 mol L⁻¹), de carbonato de sódio (0,05 mol L⁻¹), de bicarbonato de potássio (0,05 mol L⁻¹) e de ácido clorídrico (0,1 mol L⁻¹). Os frascos fechados foram agitados à temperatura ambiente durante 24 h. Em seguida, cada solução foi filtrada e o excesso de base foi titulado com HCl (0,1 mol L⁻¹). Para as amostras em contato com HCl, o excesso de ácido foi titulado com NaOH (0,1 mol L⁻¹). O número de grupos ácidos foi calculado sob o pressuposto de que o NaOH reage com grupos carboxílicos, lactônicos e fenólicos, Na₂CO₃ reage com os grupos carboxílicos e lactônicos e KHCO₃ reage apenas com grupos carboxílicos.

A quantidade de cada grupo foi determinada a partir da diferença do volume de solução gasta de NaOH da titulação da amostra e do branco. A quantidade de grupos carboxílicos foi determinada por meio da titulação da alíquota de Na₂CO₃. Os grupos lactônicos foram determinados pela diferença entre a quantidade de grupos encontrados no resultado da titulação de Na₂CO₃ e NaHCO₃. A quantidade de grupos fenólicos foi calculada por meio da diferença dos grupos encontrados na titulação de NaOH e NaHCO₃. Os cálculos foram feitos de acordo com a Equação a seguir.

$$Q = \frac{V_t \cdot N_b (V_{am} - V_b)}{V_{al}} \quad (2)$$

onde Q é a quantidade de cada grupo (mmol carga grama⁻¹)

V_b e V_{am} é o volume da solução padrão de NaOH gasto nas titulações do volume do branco e do volume da amostra (mL);

V_t é o volume total da solução de HCl, NaOH, NaHCO₃, ou Na₂CO₃ (mL)

V_{al} é o volume da alíquota do filtrado (mL)

N_b é a concentração da solução de NaOH (mmol L⁻¹)

2.5 Carbono Orgânico Dissolvido

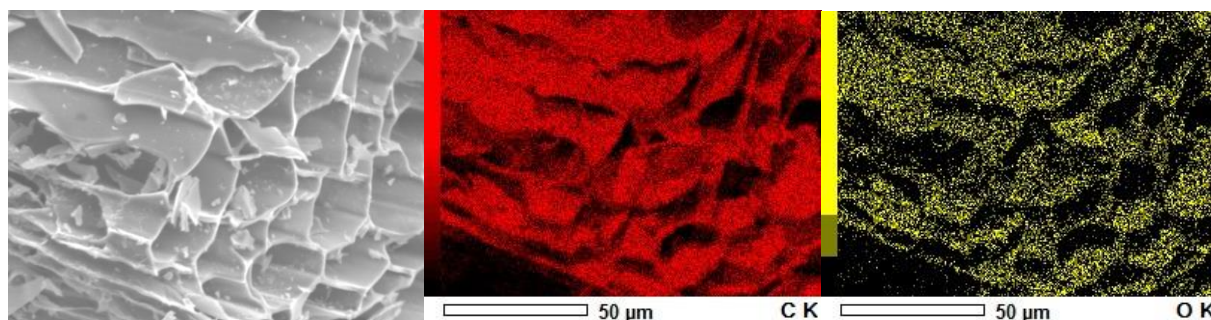
O carbono orgânico dissolvido (COD) ou carbono orgânico extraível com água (WEOC do inglês *Water Extractable Organic Carbon*) presente nos *biochars* foi analisado com a finalidade de verificar a contribuição de inserção de COD no solo como condicionante. A determinação do COD se deu por experimentos de batelada e foi determinado pela solução resultante do contato das amostras de *biochar* com solução aquosa na relação 1:75 (mv^{-1}). Esses sistemas foram mantidos em agitação constante (100 rpm) por 35 dias à 30 °C. Ao final do processo, as amostras foram filtradas (Chromafil(R) Xtra - PTFE-45/25 - 0,45 μm) e mantidas sob refrigeração até a análise. As determinações de COD foram realizadas pelo equipamento Analytik Jena multi N/C 3100.

2.6 Microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva

As diferentes amostras de *biochars* produzidos foram caracterizadas quanto à morfologia de sua superfície (estrutura microscópica) por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e quanto à sua informação microscópica superficial de elementos químicos por intermédio de espectroscopia de energia dispersiva (EDS, do inglês *Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy*) (JEOL JSM-6010LA Analytical Scanning Electron Microscope).

Previamente às análises de MEV/EDS, as amostras foram submetidas à secagem em estufa a 55 °C por 12 horas (Dai *et al.*, 2013) para eliminação da umidade intersticial. Em seguida, as amostras foram metalizadas com Au/Pd pelo processo de *sputtering* (evaporação do metal e deposição de uma fina camada de 10 nm sobre a amostra - Denton Vacuum Desk V), com a finalidade de melhorar a condutividade da superfície. As amostras foram colocadas em uma fita de carbono e analisadas via MEV aplicando-se um potencial de aceleração na faixa de 5 kV para imageamento e 10 kV para as análises de EDS (voltagem de aceleração para a geração do feixe de elétrons). Em todas as medidas de EDS tomou-se o cuidado de analisar somente as áreas das amostras de *biochar*, onde o porta amostra e outros interferentes não contribuíram para o sinal obtido, como mostra a Figura 5. As micrografias de MEV foram obtidas nas resoluções de 5 a 200 μm e as análises de EDS foram conduzidas em resoluções de 20 μm .

Figura 5 – Cobertura do feixe de elétrons das análises de EDS para as amostras de *biochars*.



Fonte: Autoria própria

2.7 Espectros de infravermelho com transformada de Fourier e Espectroscopia RAMAN

Para a obtenção de informações sobre os grupos funcionais da superfície dos *biochars* produzidos para as diferentes temperaturas, um Espectrômetro no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR, do inglês, *Fourier Transformation Infrared*) (Jasco modelo FTIR-410) foi utilizado. Todos os espectros de FTIR foram coletados na região do infravermelho médio ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$), utilizando 16 cm^{-1} de resolução espectral e 32 acumulações (Dai *et al.*, 2013). As amostras foram preparadas por mistura de amostras com KBr (grau espectroscopia) num almofariz de ágata e, posteriormente, confeccionas pastilhas.

Complementarmente, o elemento carbono pode apresentar várias fases amorfas e cristalinas segundo o tratamento térmico, gerando propriedades morfológicas totalmente diferentes entre si. Logo, a espectroscopia RAMAN foi utilizada para caracterizar essa ordem estrutural dos *biochars*. O uso de espectrometria RAMAN permite a caracterização direta das porções de *char*, considerando, assim, a heterogeneidade do carvão e *char*, propriamente ditos (Guedes *et al.*, 2012). Por meio da caracterização de RAMAN se procurou verificar os espectros de diferentes formas alotrópicas e morfológicas de carbono, como materiais gráfiticos em geral e carbonos amorfos e, buscando assim, estabelecer diferenças ou semelhanças dos espectros de cada uma das amostras de *biochars* produzidos de acordo com a temperatura de pirólise.

As amostras foram imobilizadas em um suporte de vidro e os espectros foram obtidos por um tempo de integração de 3 segundos, como acumulações em triplicata em um Microscópio Confocal RAMAN *alpha300r* (WITec). O comprimento de onda de excitação utilizado foi de 632,77 nm, com gradeamento de 150. Os dados foram analisados pelo *software* WITec Project v.2.10.

2.8 Análise de molhabilidade/ repelência de água

A técnica de determinação do ângulo de contato ou molhabilidade (θ) permite verificar a manifestação macroscópica da interação molecular entre sólidos e líquidos em contato direto na interface entre eles, *i.e.*, é a quantificação das forças coesivas do líquido e as forças adesivas entre o sólido e o líquido (Bialopiotrowicz, 2003). A análise de molhabilidade foi realizada por um goniômetro automatizado para medidas de ângulo de contato e energia de superfície (RAMÉ-Hart 100-00 - LaPTec), que, por meio de uma câmera CCD, captura a imagem da gota depositada sobre as amostras analisadas. O *software* ramé-hart DROPimage series foi utilizado para o tratamento de imagens adquiridas, determinando, assim, o perfil das gotas de água depositadas e, em seguida, calculando o ângulo de contato em 10 medidas consecutivas. Adicionalmente, foi verificada a repelência de água segundo a metodologia descrita pelo Departamento de Recursos Naturais Sustentáveis da Austrália (*Department of Sustainable Natural Resources / P22A/1 - Water Repellency*) (Government, 2011), que indica a hidrofobicidade de materiais pedológicos.

2.9 Ressonância magnética nuclear – RMN ^{13}C

Sendo os *biochars* produtos intrinsecamente carbonáceo, o estudo dos núcleos de carbono via ressonância magnética nuclear é importante para determinar as estruturas das moléculas orgânicas por meio da determinação do número de carbonos não equivalentes, bem como pela identificação dos tipos de átomos de carbono presentes nas amostras (*i.e.* metil, metileno, aromático, carbonila, etc.). Logo, pode-se afirmar que as análises de RMN dão informações relevantes sobre a estrutura carbonácea e mineral presente em uma molécula/ amostra. Desta forma, os *biochars* produzidos foram submetidos a análises de RMN ^{13}C . Tais análises foram realizadas no Instituto de Química da UNESP de Araraquara, em um espectrômetro Bruker (modelo Avance III 400 MHz WB) operando na frequência de 50,3 MHz. As amostras (aproximadamente 100 mg) foram acondicionadas em um rotor de 4mm e posteriormente analisadas nas seguintes condições experimentais: banda espectral para polarização cruzada, magic-angle spinning, de 5,5 kHz, pulso de preparação do próton de 4 μs , tempo de contato de 2 ms, tempo de aquisição de 20 ms e tempo de espera para relaxação de 5 s. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm. Os dados foram analisados por meio do software ACD/RMN Processor Academic Edition (Stevenson, 1994). As parcelas de

dos grupos de carbono presente nas amostras foram obtidas por meio da integração dos picos presentes nos espectros de acordo com a metodologia descrita por Stevenson (1994).

2.10 Análise BET – Área superficial

A avaliação da área superficial é um importante parâmetro a ser determinado para verificar a capacidade de adsorção do material e sua estrutura porosa como um todo. A área superficial dos *biochars* foi determinada por meio de adsorção de N₂ em suas superfícies em um BET Surface Area Analyzer (Micromeritics ASAP 2020). BET e isotérmicas de Langmuir foram geradas para determinar a área de superfície de um único ponto. Esta técnica de análise desenvolvida pelos pesquisadores Brunauer, Emmett e Teller (B.E.T.) compreende a caracterização da amostra nos aspectos de área da superfície específica e medida de poros/microporos, a partir da adsorção gasosa pela amostra para realização deste ensaio. Esta análise foi realizada na École Nationale Supérieure de Géologie (E.N.S.G.) Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC) Université de Lorraine, França.

2.11 Difrátômetro de Raios-X

Os métodos de difração de raios-X são os mais efetivos e, portanto, mais utilizados, para a caracterização da estrutura cristalina de diversos materiais. Além disso, a difração de raios-X pode identificar compostos químicos presentes na estrutura cristalina, permitindo que diferentes compostos (ou fases) que possuem a mesma composição possam ser identificadas. Este tipo de análise visa à identificação (busca de compostos presumivelmente presentes na amostra) e quantificação.

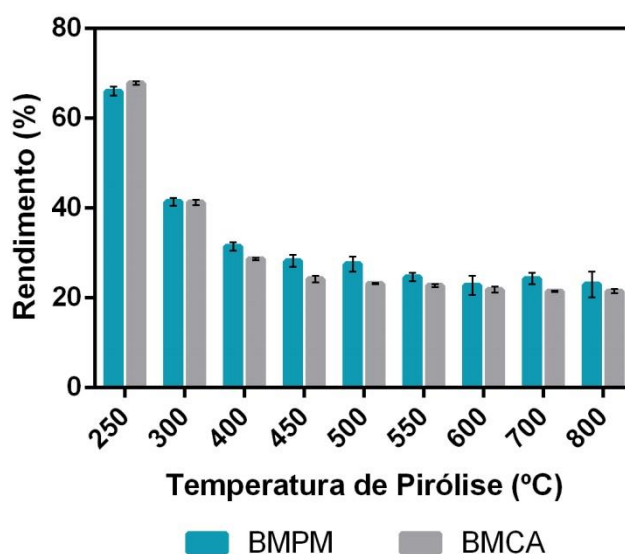
Para a obtenção de dados adequados e de qualidade para a identificação das fases e estruturas cristalinas referentes aos arranjos atômicos presentes nos *biochars* produzidos em diferentes temperaturas, o Método do Pó foi utilizado. A identificação das fases cristalinas foi obtida por meio da comparação dos difratogramas das amostras com os bancos de dados *DF2 ICDD-International Centre for Diffraction Data 2003* e *PAN-ICSD-Inorganic Crystal Structure Database PANalytical 2007*. A calibração do equipamento foi realizada com o material Alumina alfa Al₂O₃, que já possui as posições de seus picos conhecidas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Rendimento da pirólise

A degradação da lignocelulose começa em temperaturas acima de aproximadamente 120 °C e é dominada pelo processo de formação de gás e *char* em temperaturas de produção abaixo de 300 °C (Amonette e Joseph, 2009), sendo esta uma das razões pela qual *biochar* produzidos abaixo dessa temperatura apresentam o maior rendimento mássico de produção (Figura 6). A volatilização de gases durante a pirólise lenta, diminui a dimensão das partículas de biomassa de origem de 6 e 27 vezes (com base no diâmetro médio), deixando um fino pó de carvão fragmentado como produto pirolíticos (Bruun *et al.*, 2011).

Figura 6 - Efeito da temperatura de pirólise no rendimento da produção de *biochar* em atmosfera inerte e com oxigênio rarefeito. BMPM indicam *biochars* BPM e BMCA indicam *biochars* BCA.



média ± desvio padrão em triplicata

Fonte: Autoria própria

O decréscimo do rendimento pode ser atribuído a uma maior influência decorrente da decomposição primária e/ ou ainda da decomposição secundária dos resíduos de *char* (Angin, 2013). Contudo, o rendimento elevado da produção de *biochar* em temperaturas baixas indica que o material foi parcialmente pirolisado (Katyal *et al.*, 2003). Com o aumento da temperatura de pirólise, principalmente entre 250 e 600 °C, a formação de *tar* começa a

acontecer e se torna uma via particularmente importante, pois tem como consequência a diminuição do rendimento do *biochar* produzido. O subproduto *tar* é composto, principalmente, de açúcares anidros, como levoglucosano (1,6-anidro- β -D-glucopirranose), que por sua vez é um indicador de queima da biomassa, sendo menos reativo que os radicais livres gerados pela quebra homolítica das ligações químicas nos estágios iniciais da pirólise (Shafizadeh, 1982). Por causa das razões de transferência de massa e de calor nesse intervalo de temperatura de pirólise, também pode ocorrer a volatilização e reações de fissão dos açúcares anidros, desfavorecendo a formação de *char* (Amonette e Joseph, 2009).

Em temperaturas de pirólise acima de 600 °C, a volatilização é suficientemente alta para que as vias de formação de gases sejam predominantes e a formação de *biochar*, *tar* e líquidos sejam mínimas, e as amostras iniciam uma tendência de estabilização do rendimento de produção, onde, portanto, a temperatura de pirólise e tipo de biomassa não são mais parâmetros significativos. Para *biochars* produzidos a partir de BMPM o decréscimo do rendimento de produção, da menor temperatura de pirólise para a maior, foi de 34,82%. Já para *biochars* produzidos a partir de BMCA o decréscimo de produção caiu 30,97% da maior para a menor temperatura de produção, respectivamente. Esses valores indicam o rendimento é afetado pelo tipo da biomassa de origem. Para altas temperaturas (700 e 800 °C), ambas as biomassas reagiram de forma oxidativa para as condições de pirólise, alcançando a susceptibilidade de se inflamar espontaneamente quando exposto ao oxigênio nas temperaturas. Ou seja, o oxigênio presente no reator, mesmo que rarefeito, promove a gaseificação do *biochar* para monóxido e dióxido de carbono. Por causa disso, para estes materiais resultantes da pirólise eram apenas cinzas, não podendo ser classificados como *biochars*. Por causa do baixo teor de carbono nestes materiais, estes apresentaram os menores rendimentos: 24,3%, 23,0%, 21,4% e 21,5% para BPM700, BPM800, BCA700 e BPM800, respectivamente. Esses baixos valores refletem que os vapores e gases formados na decomposição térmica foram rapidamente removidos da zona de reação pirolítica antes do equilíbrio termodinâmico ser atingido. Dentre outras conclusões, a pirólise em atmosfera não inerte é um processo mais economicamente viável por não utilizar gás nitrogênio, além de ser um processo que se aproxima das condições de produção de *biochar* em reatores em áreas agrícolas.

Adicionalmente, as amostras de *biochar* foram classificadas segundo a Escala de Cores Pantone (PMS, do inglês *Pantone Matching System*) por ser um sistema numérico de cores de alta regularidade e padrão. Por meio desta análise, pode-se perceber visualmente a evolução dos estágios de pirólise, bem como que o *biochar* produzido à 250°C não foi

pirolisado completamente devido a sua cor tipicamente marrom escuro (Figura 7B) (Boateng e Mullen, 2013). A partir da temperatura de pirólise de 300°C, as pirólises foram completas (Figura 7C), havendo apenas algumas variações pequenas de cor, possivelmente relacionada com o teor de cinzas e minerais presentes em cada amostra (Tabela 1). Para a biomassa de bagaço de cana-de-açúcar, todos os *biochars* produzidos apresentaram coloração variando entre Pantone Black C e Pantone Black 7C, indicando que mesmo para baixas temperaturas de produção a pirólise foi completa.

Figura 7 - Evolução da mudança de cor desde a biomassa crua até a pirólise completa da mesma. (A) Biomassa crua de palha de milho; (B) *Biochar* produzido a 250 °C, indicando a pirólise incompleta e; (C) *Biochar* produzido em 300 °C, mostrando a pirólise completa.



Fonte: Autoria própria

Tabela 1 - Análise de cor segundo a Escala de Cores Pantone (PMS).

AMOSTRA	CÓDIGO PMS	AMOSTRA	CÓDIGO PMS
BMPM	Pantone 141C	BPM250	Pantone 7533C
BPM300	Pantone Neutral Black C	BPM400	Pantone Neutral Black C
BPM450	Pantone Neutral Black C	BPM500	Pantone Black C
BPM550	Pantone Black C	BPM600	Pantone Black 7C
BPM700	Pantone Black 412C	BPM800	Pantone Black 412C

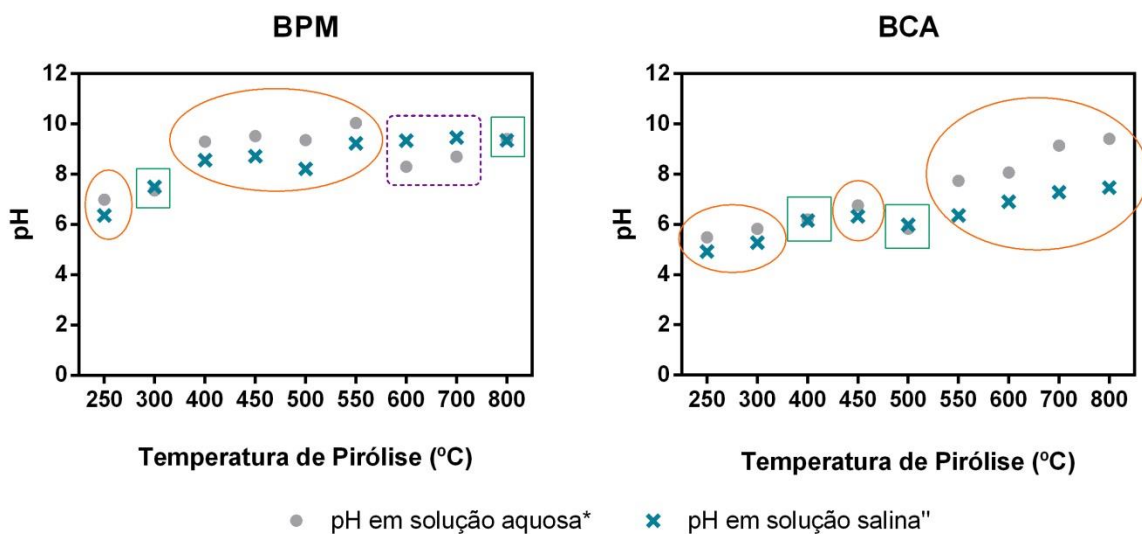
Fonte: Autoria própria

3.2 pH

O pH do solo é um dos índices mais importantes na avaliação das condições de nutrição vegetal, pois afeta a solubilidade e a disponibilidade de vários nutrientes, a atividade de microrganismos pedológicos, bem como sua sobrevivência e o número de cargas elétricas do solo (Almeida e Ernani, 1996). Sendo assim, o pH é um índice importante para determinar

a escolha de um *biochar* para aplicação pedológica. Na Figura 8A e B, pode-se observar a variação dos valores referentes ao potencial hidrogeniônico dos *biochars* produzidos sob diferentes temperaturas de pirólise para BPM e BCA, respectivamente. Os valores de pH variaram de 6,98 a 9,39 para solução aquosa e de 6,35 a 9,34 medições em solução salina, onde nota-se que os valores do pH dos *biochar* aumentaram, de modo geral com o aumento das temperaturas de pirólise.

Figura 8 - Efeito da temperatura de pirólise no pH de *biochar* de biomassa de palha de milho (BPM) e; de biomassa de bagaço de cana de açúcar (BCA).



Fonte: Autoria própria

Os resultados mostrados na Figura 8 indicam que a acidez total nas amostras de *biochar* de BPM, de um modo geral, diminuiu com o aumento da temperatura de pirólise devido à remoção de ácidos carboxílicos, fenóis, e lactonas. A basicidade total das amostras aumentou com o aumento da temperatura de pirólise por causa da concentração de grupos funcionais de base, tais como cetonas, carbonatos, pirenos, e cromenos. A diminuição da densidade de grupos funcionais de superfície com o aumento da temperatura de pirólise também indicam que houve um aumento de aromaticidade e uma diminuição na polaridade dos *biochars* produzidos a temperaturas elevadas (Ahmad *et al.*, 2013; Al-Wabel *et al.*, 2013). De forma geral, os valores de pH observados para os *biochars* BPM e BCA indicaram as amostras tinham um potencial de geração de caráter mais básico do que o ácido. À medida que a temperatura de pirólise aumenta, os *biochars* se convertem para estruturas de grafite

com mais planos basais (onde os grupamentos básicos estão deslocalizados – elétrons π), o que faz com que o pH aumente (Liu *et al.*, 2015) (Bandosz, 2006).

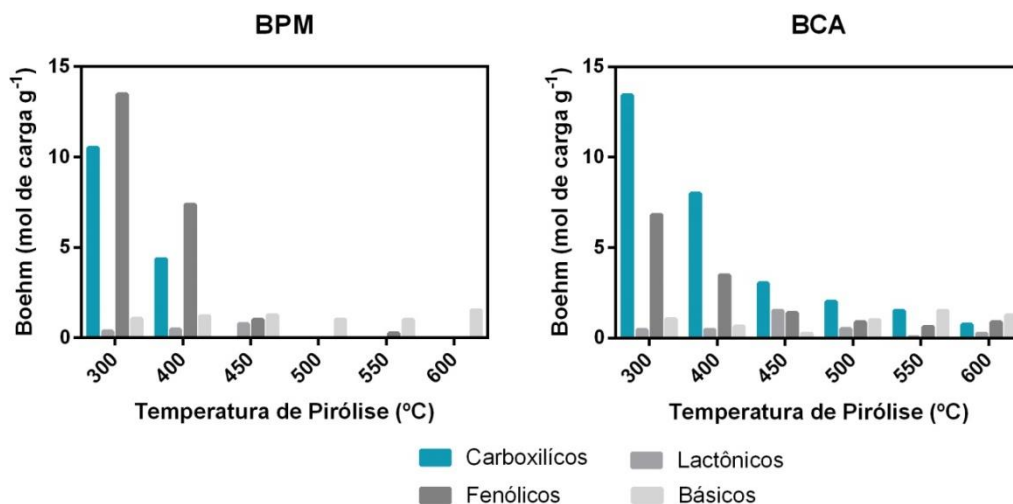
O mesmo comportamento foi observado para os *biochars* produzidos a partir de BMCA. Entretanto, a variação de pH dos *biochars* produzidos de menores a maiores temperaturas não foi tão acentuada. Por exemplo, para os *biochars* de BMPM os valores de pH variaram de 6,9 a 10,1 em solução aquosa e 3,3 a 9,4 em solução salina. Já para os *biochars* de BMCA os valores variaram de 5,5 a 9,4 para solução aquosa e 4,9 a 7,4 para solução salina. Na Figura 8 ainda são destacados grupos onde predominam grupos funcionais positivos (quadrado roxo tracejado), negativos (círculo laranja) e neutros (quadrado verde). Esses grupos são determinados pelas diferenças entre os valores de pH aferidos em solução aquosa e salina, onde valores iguais indicam que as amostras retêm cátions e ânions na mesma proporção e em baixas quantidades; valores de pH em solução aquosa maiores quando comparados aos aferidos para solução salina indicam que as amostras indicadas pelos círculos laranjas possuem predominância de cargas negativas e, assim, os *biochars* retêm mais cátions que ânions. Quando há predominância de cargas positivas, os *biochars* tendem a reter mais ânions que cátions. As amostras produzidas a partir de BMCA não apresentaram cargas positivas para nenhuma temperatura de pirólise, enquanto que as amostras BPM600 e BPM700 apresentaram esse comportamento. Estas variações são importantes, pois visto que o *biochar* é recalcitrante, sua aplicação no solo pode influenciar os valores de pH do solo por um longo período de tempo. Existem estudos que comprovam que o aumento significativo do pH do solo pela aplicação de *biochar* ou carvão levaram à deficiência de absorção de micronutrientes em plantas de soja, bem como a retardação do crescimento de plantas não adequadas para solos calcários, mesmo após 110 anos de aplicação (Mikan e Abrams, 1995). Além disso, altos valores de pH podem favorecer a promoção do crescimento de fungos em detrimento de bactérias promotoras do crescimento de plantas.

3.2.1 Grupos funcionais superficiais - Método de Boehm

Os grupos funcionais do *biochar* são modificados por meio da pirólise e estes são importantes para a classificação quando à biodegradabilidade dos *biochars* (Preston e Schmidt, 2006), bem como afeta a sua interação com o ambiente no qual é inserido está diretamente (relacionada com a quantidade de grupos de oxigênio presentes em sua superfície) (Boehm, 1994).

Por meio da Figura 9 é possível observar que para os *biochars* produzidos da biomassa de palha de milho, acima da temperatura de pirólise de 400 °C, os grupamentos carboxílicos, lactônicos e fenólicos diminuem e desaparecem, respectivamente, restando somente os grupos básicos, como cromenos e pironas. A presença de grupamentos básicos pode contribuir para o retardamento do crescimento de plantas devido à possível deficiência de disponibilização de nutriente para as raízes, bem como apresentar atividade biológica que inibem o desenvolvimento e crescimento de bactérias e fungos (Almeida, 2015). Por outro lado, para os BCAs a queda da quantidade e presença desses grupamentos ocorre de forma decrescente, sendo presentes em todas as amostras produzidas. Este dado corrobora com o relatado por Badosz (2006), que afirma que os *biochars* tipicamente têm superfícies anfotéricas, com grupos funcionais ácidos e básicos. Os resultados da análise de Boehm corroboram com os de pH, visto que ácidos carboxílicos, lactonas, fenóis e cetonas tornam o *biochar* mais hidrofílico e ácido.

Figura 9 - Efeito da temperatura de pirólise nos grupamentos superficiais dos *biochar* de biomassa de palha de milho (BPM) e; de biomassa de bagaço de cana de açúcar (BCA).



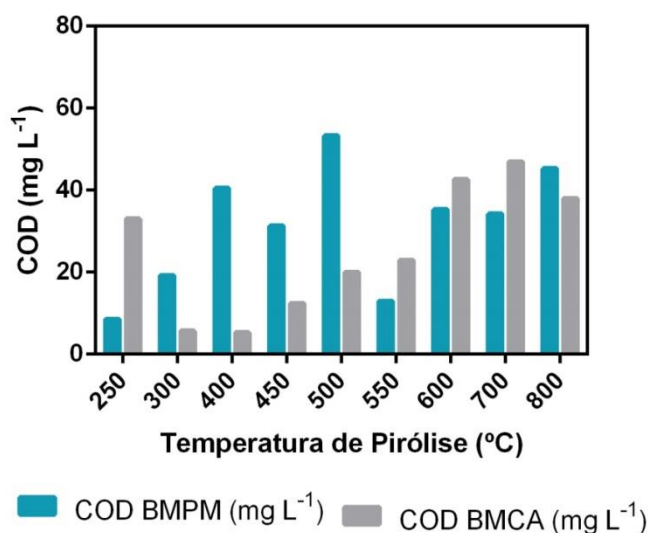
Fonte: Autoria própria

3.3 Carbono Orgânico Dissolvido

Sabe-se que o teor de carbono orgânico dissolvido (COD) no solo é uma propriedade importante no que diz respeito ao funcionamento do ciclo biogeoquímico do carbono,

nitrogênio e fósforo, bem como influencia no transporte de nutrientes e poluentes (Lin, Munroe, Joseph e Henderson, 2012) e na atividade microbiológica do solo. Em adição, o COD liberado de *biochars* podem incluir biopolímeros, substâncias húmicas, produtos de oxidação ou degradação de substâncias húmicas, compostos neutros de baixo peso molecular e ácidos de baixo peso molecular (Lin, Munroe, Joseph, Henderson, *et al.*, 2012), onde geralmente são compostos fenólicos e aromáticos policíclicos (Riedel *et al.*, 2014). Dessa forma, sendo o *biochar* um condicionante de solo, é necessário investigar seu potencial para liberar teores de COD e, assim, construir de forma mais confiável uma base de dados para aplicação pedológica. Neste contexto, uma série de experimentos em batelada foi conduzida para avaliar o potencial dos *biochars* produzidos a partir de BMPM e BMCA na liberação de COD em soluções aquosas (carbono orgânico extraível em água). Em geral, como mostra a Figura 10, os teores de COD não apresentaram linearidade conforme a mudança de temperatura de pirólise. Entretanto, este fator foi influenciado pelo tipo de biomassa de origem.

Figura 10 - Efeito da temperatura de pirólise na quantificação de carbono orgânico dissolvido (total) nas amostras de *biochar* de biomassa de palha de milho (BMPM – barras azul) e; (B) de biomassa de bagaço de cana de açúcar (BMCA – barras cinza).



Fonte: Autoria própria

O teor de COD liberado pela amostra BPM550 chamou a atenção por ser bastante elevado quando comparado às outras amostras analisadas. Esse aumento pode ser explicado, em específico para a biomassa BMPM na temperatura de 550°C, por meio dos produtos formados

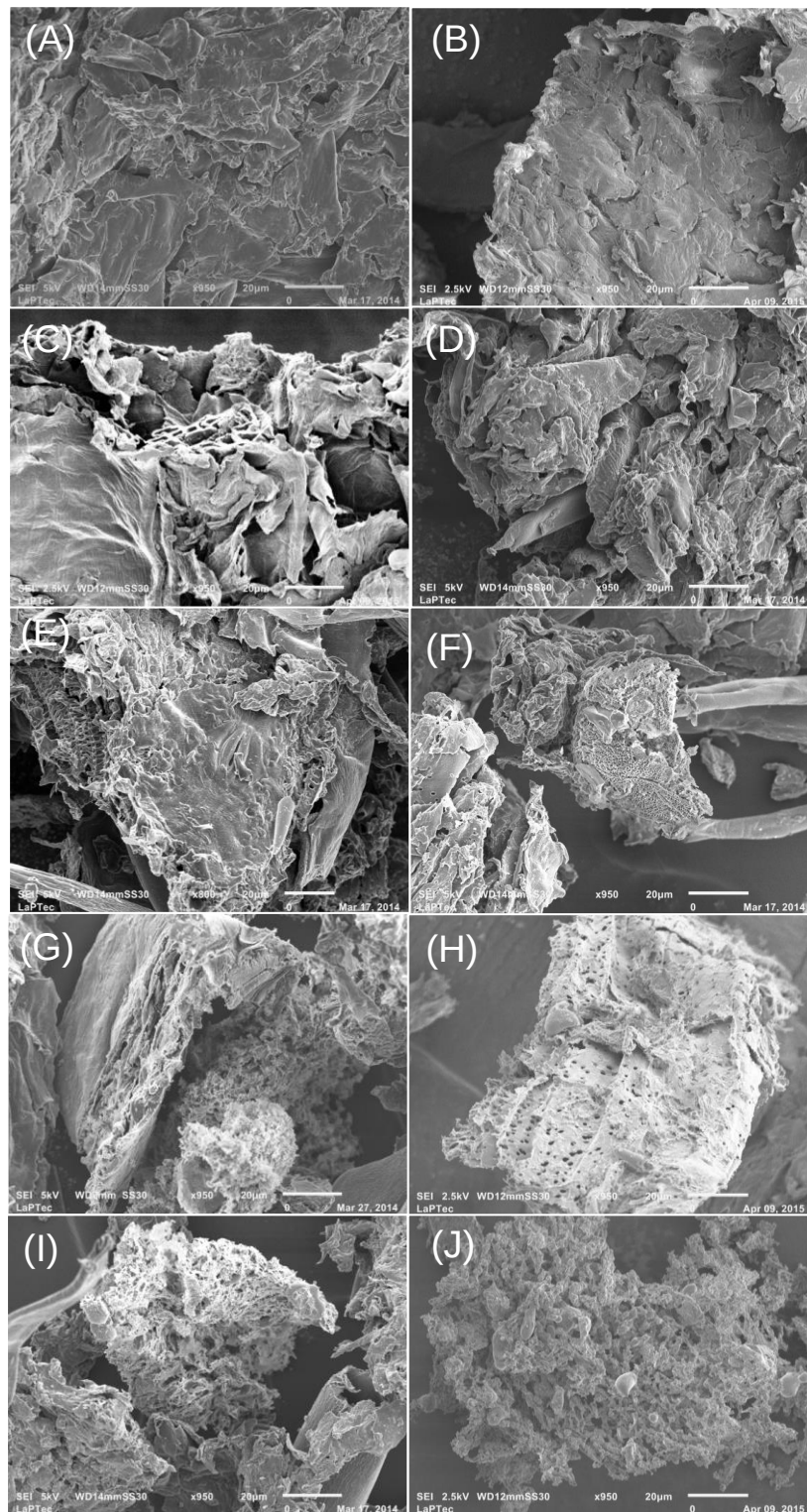
durante a pirólise. Tais produtos podem ter sofrido uma decomposição por meio de rearranjo, condensação, ciclização e polimerização através de uma série de reações consecutivas e secundárias intrínsecas do processo de pirólise, conduzindo à formação de novos compostos, como carbono lábil, por exemplo. O BPM550, em particular, pode ser benéfico e utilizado por microrganismos pedológicos nos solos condicionados com este *biochar*, favorecendo a atividade e manutenção da comunidade microbiológica, bem como aumentando o teor de matéria orgânica do solo (Anderson *et al.*, 2011).

3.4 MEV e EDS

Devido ao complexo conjunto de reações químicas que ocorre durante o processamento térmico, um elevado grau de heterogeneidade química se estende à escala microscópica, mesmo dentro de um único *biochar* (Amonette e Joseph, 2009). Dessa forma, cada *biochar* produzido com um tipo de biomassa e combinação de processamento térmico, apresenta uma única mistura de fases e microambientes que fornece um conjunto de características físicas e químicas singulares. Para compreender melhor as mudanças de fase e microambientes nas amostras de *biochar*, tanto as biomassas de origem foram submetidas a uma caracterização microestrutural via MEV e EDS, como as amostras de *biochar* delas.

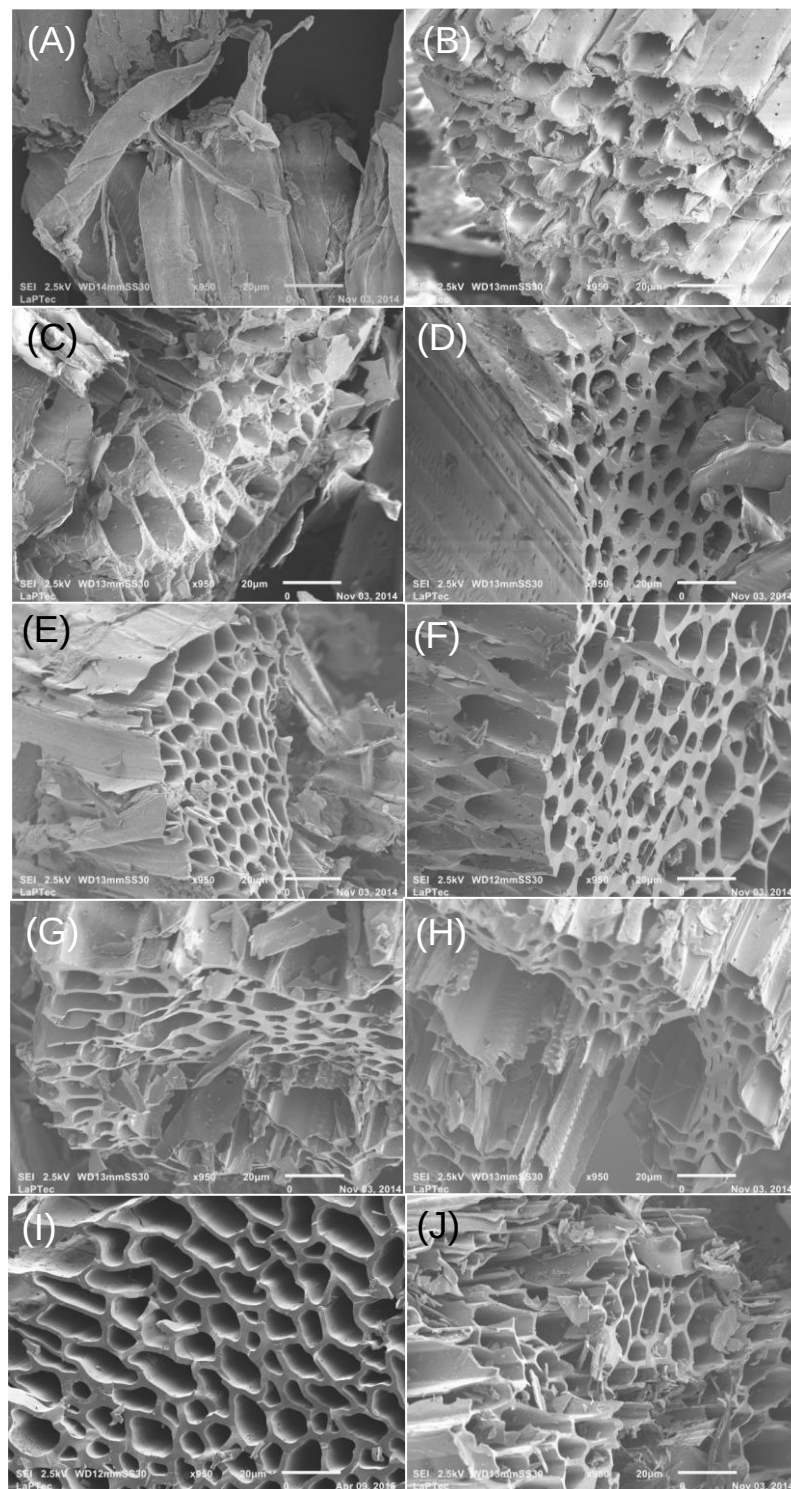
De modo geral, para a amostra BMPM triturada (Figura 11A), observou-se que os grânulos não possuem nenhuma estrutura complexa de poros, constituindo-se apenas de uma massa densa vegetal. As micrografias obtidas nesse estágio cru da biomassa servem como referência para observar sua estrutura original e a evolução dos rearranjos microestruturais nas amostras de *biochar*, como rachaduras e poros, por exemplo. Em adição, a estrutura original dos materiais orgânicos de origem é impressa em seu produto pirolítico, e, portanto, tem uma influência determinante sobre as suas características físicas e estruturais finais (Wildman e Derbyshire, 1991).

Figura 11 – Evolução da microestrutura dos *biochars* produzidos a partir de biomassa de palha de milho. (A) Biomassa crua triturada; (B) BPM250; (C) BPM300; (D) BPM400; (E) BPM450; (F) BPM500; (G) BPM550; (H) BPM600; (I) BPM700 e; (J) BPM800.



Fonte: Autoria própria

Figura 12 – Evolução da microestrutura dos *biochars* produzidos a partir de biomassa de bagaço de cana-de-açúcar. (A) Biomassa crua triturada; (B) BCA250; (C) BCA300; (D) BCA400; (E) BCA450; (F) BCA500; (G) BCA550; (H) BCA600; (I) BCA700 e; (J) BCA800.



Fonte: Autoria própria

Os aspectos morfológicos e a evolução da porosidade dos *biochar* preparados a partir da biomassa de bagaço de cana-de-açúcar também foram avaliados por meio de microscopias e apresentaram comportamento diferente do verificado para os *biochars* produzidos a partir da biomassa de palha de milho, como visto na Figura 12. O *biochar* BPM250 apresentou estruturas morfológicas semelhantes à de sua biomassa de origem, onde a biomassa começou a sofrer a decomposição térmica, iniciando sua fundição, modificação estrutural e início da formação de poros (Sharma *et al.*, 2004) na micrografia da amostra BPM300. Esses poros inicialmente observados para os *biochars* de baixa temperatura indicam o início da liberação dos gases voláteis aprisionados dentro da biomassa de origem (Zhao *et al.*, 2017). Com o aumento da temperatura de pirólise, a estrutura porosa foi aumentando, mas não em ordem uniforme e homogênea, indicando ainda, possivelmente, material volátil preso à estrutura.

As micrografias mostradas nas Figuras 11 e 12 mostram claramente a influência que a biomassa de origem exerce nas características morfológicas durante a produção de *biochar*. A morfologia da biomassa de cana-de-açúcar (Figura 12A) e a evolução para o BCA250 (Figura 12B) nota-se claramente que a formação de poros já é evidente. Por ser uma planta classificada como C4 (tipo de mecanismo bioquímico para fixar do carbono), a estrutura fisiológica da cana-de-açúcar é constituída de células com paredes espessas e pouco permeáveis, tornando essa matriz altamente ordenada. Já a palha do sabugo de milho (brácteas) são estruturas foliáceas com a função de proteção dos grãos. Essa diferença fisiológica e funcional pode ser claramente observada com a evolução da decomposição térmica da biomassa. Para a biomassa BPM os poros somente aparecerem para *biochars* produzidos a partir de 400 °C. Ao mudar-se a biomassa para BMCA a macroporosidade tornou-se predominante desde o primeiro regime de temperatura utilizada na pirólise.

A macroporosidade é uma característica importante nos *biochars*, pois os macroporos são aqueles que alimentam micro e mesoporos no que diz respeito ao transporte de fluídos, principalmente quando os *biochars* são utilizados como materiais adsorventes. Os macroporos são mais importantes ainda quando se trata do gerenciamento e manutenção da qualidade pedológica quando utilizados como condicionantes; estas estruturas são relevantes para a sustentação de funções como aeração e retenção de água, bem como permitem o movimento de raízes de plantas e servem de habitat para microrganismos pedológicos colonizarem. A partir das

amostras de BCA450 (Figuras 12E a 12J) nota-se uma maior uniformidade da formação dos poros para ambas as atmosferas de produção investigadas.

O *biochar* BPM600 apresentava uma estrutura porosa desordenada provocada principalmente pela fusão promovida pela temperatura de pirólise. Isto não ocorre para o *biochar* BCA600, que apresenta estrutura porosa bem definida.

Entretanto, ao que mostra a Figura 12I e 12J, estes fatores como o aumento da gaseificação oxidativa esperadas para estas temperaturas não interferiram na morfologia e desenvolvimentos dos poros das amostras BCA700 e BCA800, o que pode sugerir que a biomassa de bagaço de cana-de-açúcar apresenta maior resistência à degradação térmica quando comparada com a biomassa BMPM.

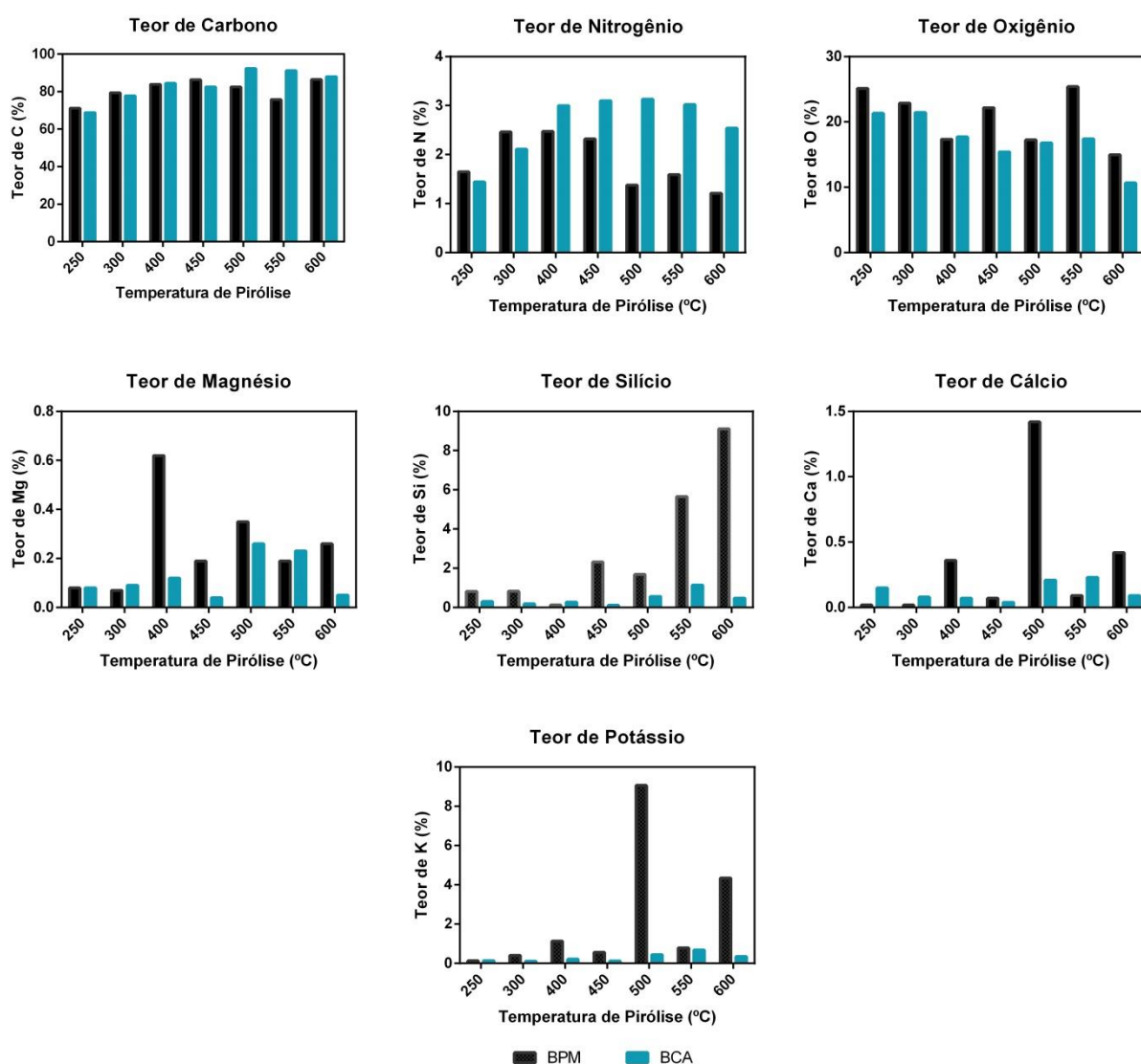
As propriedades dos diferentes tipos de *biochar* (para ambas as biomassas) produzidos foram avaliadas por intermédio do monitoramento nas alterações elementares superficiais relacionadas com os conteúdos dos minerais aprisionados. Os fatores como tipo da biomassa e condições de processamento térmico são os que controlam a quantidade e distribuição da matéria mineral nos *biochars* (Amonette e Joseph, 2009). Os teores de minerais aprisionados são decorrentes dos conteúdos dos mesmos presentes na biomassa de origem que são expostos devido à perda de C, H e O durante a etapa de pirólise. Além da biomassa de origem, a temperatura e as condições subestequiométricas de oxigênio da pirólise também controlam os teores da composição elementar dos *biochars*.

Do ponto de vista composicional, os maiores constituintes da biomassa (*i.e.* C, H e O) são volatilizados durante os primeiros estágios da decomposição térmica: a desidratação e pirólise. Nelas, o H e O são perdidos proporcionalmente em maiores quantidades que o C. As perdas de H e O estão relacionadas com a perda de água, inicialmente, e como hidrocarbonetos, vapores, *tar*, CO e CO₂ (Antal e Gronli, 2003). Por meio das análises semi-quantitativas dos elementos presentes na superfície dos *biochars* produzidos via EDS, a proporção de teores de carbono nas fases sólidas aumentam da ordem de 60 a 90% em massa, depois da pirólise em 250 °C (Figura 13).

Os teores de nitrogênio encontrados nas superfícies das amostras estão relacionados com centros de alta basicidade (Amonette e Joseph, 2009), bem como aminas pirrólicas ou piridínicas. Os teores de oxigênio já são relacionados com os grupos funcionais presentes nos *biochars*, como grupos carboxilas, carbonilas e fenóis. O magnésio está associado a moléculas orgânicas onde é

ligado de forma iônica ou covalente, sugerindo, portanto, que o tipo de decomposição térmica que ocorre em BPM400 expõe maior quantidade deste tipo de moléculas. Já existem evidências que a presença de magnésio em *biochars* é um fator significativo para aumentar a habilidade dos mesmos em adsorver fósforo e compostos fosfatados (Yao *et al.*, 2011).

Figura 13 - Análise semi-quantitativa dos elementos da superfície das amostras de *biochar* produzidos em diferentes temperaturas por EDS: Intensidade e porcentagem em massa dos elementos encontrados.



Fonte: Autoria própria

Os teores de cálcio e silício são liberados na superfície do *biochar* de acordo com a degradação térmica sofrida pelo material, sendo que o cálcio é advindo, primariamente, das paredes celulares e de ácidos orgânicos (Amonette e Joseph, 2009). A amostra BPM500 apresenta um maior teor de impurezas naturais, como Ca, K e Mg. Esses elementos em grandes quantidades no *biochar* podem atuar como catalisadores que aceleram as reações de pirólise nos compostos de lignina e celulose, bem como no arranjo estrutural da carbonização (Shafizadeh, 1982). Este fato contribui e explica o baixo teor de grupamentos de oxigênio encontrados nas análises de Boehm, bem como o alto teor de COD para essa amostra. Este tipo de informação indica que tanto a biomassa de origem quanto as condições de pirólise controlam a composição e exposição superficial dos componentes ou grupamentos fracamente unidos, como o carbono lábil, por exemplo, que contribuem para o aumento do teor de COD. Logo, a contribuição do teor de carbono orgânico dissolvido de um *biochar* para o ambiente no qual é inserido está relacionada aos teores de impurezas naturais presentes na biomassa crua que levam à dissociação de grupos químicos fracamente ligados na estrutura carbonácea (carbono lábil e matéria volátil), bem como à ionização de compostos fenólicos (Liu *et al.*, 2015).

Na amostra de BPM600 o potássio apresentou maior mobilidade na superfície desses materiais devido à vaporização que ocorre neste intervalo de temperatura. Outros elementos como fósforo, manganês e ferro foram detectados apenas nas amostras produzidas em temperaturas acima de 600 °C para amostras produzidas por BPM. Já para amostras produzidas a partir de BMCA esses mesmo elementos só foram detectados em temperaturas abaixo de 600 °C, sendo que o fósforo não detectado em nenhuma das amostras de BCA. Este fato confirma que o fósforo presente nos *biochars* BPM está associado com compostos orgânicos complexos dentro das paredes celulares, característicos da biomassa de origem.

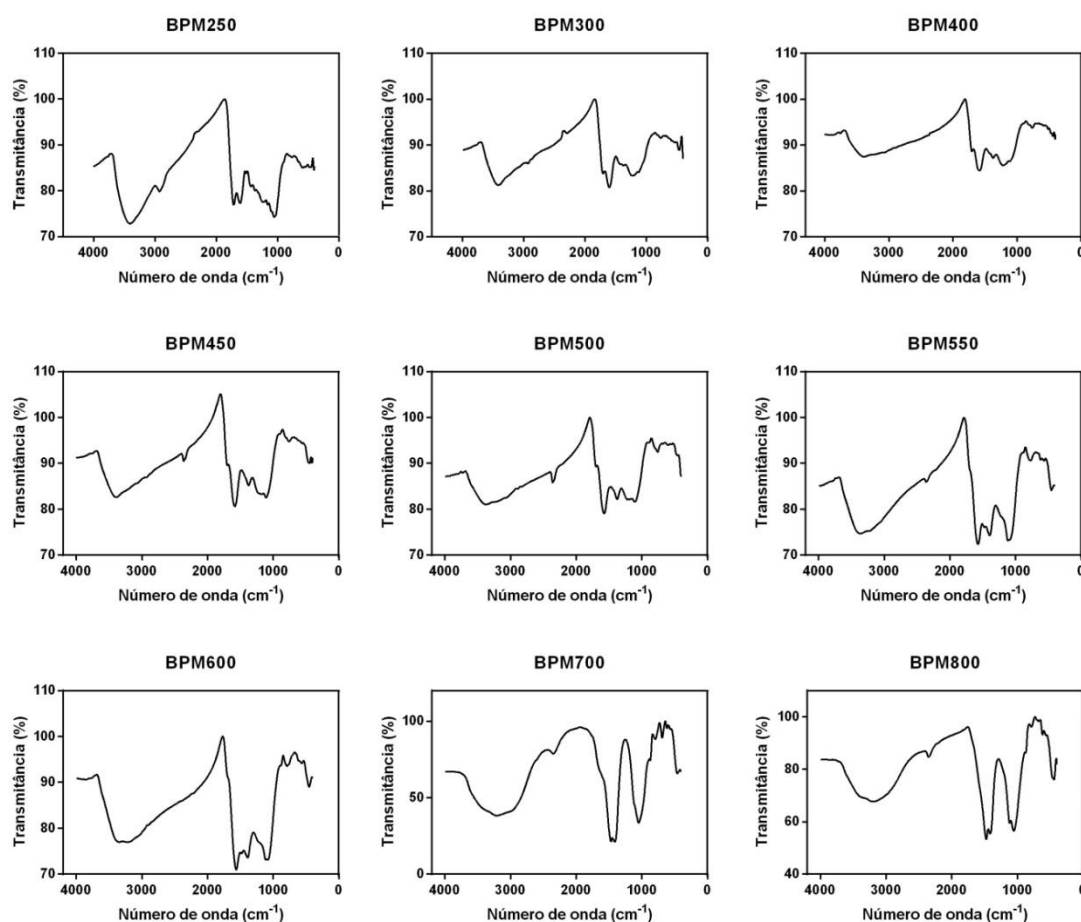
3.5 FTIR e RAMAN

Atualmente, sabe-se que os principais grupos funcionais dos *biochars*, em geral, são carbonos aromáticos e heterocíclicos (Mao *et al.*, 2012). Entretanto, como as características desses materiais variam muito conforme suas condições de processamento térmico, a investigação dos grupos funcionais presentes nos *biochars* produzidos neste trabalho é fundamental para a compreensão dos mecanismos de reação dos processos de carbonização e

suas implicações na expressão dessas características no ambiente (Li *et al.*, 2013). A evolução da estrutura do *biochar* sob diferentes regimes de temperaturas pode eficazmente explicar o mecanismo de pirólise. Assim, métodos como espectroscopia de infravermelho, espectroscopia RAMAN foram realizados para analisar a evolução da informação superficial dos *biochars* produzidos.

Analisando os espectros de FTIR na Figura 14, nota-se que os espectros dos *biochars* produzidos a partir da palha do sabugo de milho apresentam grandes semelhanças para as bandas presentes em cada amostra. Na Tabela 2 são destacadas as principais bandas que caracterizam cada *biochar*, nos nove regimes de pirólise analisados.

Figura 14 – Espectros de FTIR para *biochars* produzidos a partir de BMPM.



Fonte: Autoria própria

As bandas indicadas na Tabela 2 demonstraram que os *biochars* produzidos nas temperaturas de 250, 300 e 400 °C apresentam bandas na região de 3400 cm^{-1} , que indicam a deformação axial --OH , que é correspondente às funções fenólicas que podem conferir caráter hidrofóbico à estas amostras (Jindo *et al.*, 2014). Com o aumento da temperatura de pirólise, rearranjos estruturais são provocados de forma que compostos oxigenados de carbono orgânico e compostos nitrogenados fiquem expostos e intercalados nas fases minerais. Isso pode ser percebido, pois a partir de 450 °C, na região de $3300\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$, são encontradas bandas de deformação axial de --OH e NH que caracterizam funções fenólicas e aminas primárias (Chia *et al.*, 2012). Bandas de estiramento assimétricas (2935 cm^{-1}) e simétricas (2885 cm^{-1}) referentes ao estiramento da ligação C-H de grupos funcionais aldeídos também foram encontradas (Uchimiya *et al.*, 2013).

As bandas vibracionais encontradas na região de $1600\text{--}1740\text{ cm}^{-1}$ refletem os principais grupos éster carbonila de hemicelulose (Uchimiya *et al.*, 2013), que são encontradas apenas em amostras produzidas até 500 °C. Bandas na região de 1500 cm^{-1} são referentes às vibrações dos grupos aromáticos, presentes nas amostras BPM300 à BPM600 (Mimmo *et al.*, 2014a). Já na região de 1400 cm^{-1} , compostos aromáticos também apresentam bandas características para BPM250, BPM700 e BPM800 (Chun *et al.*, 2004). Em 1300 cm^{-1} , podem-se verificar sinais vibracionais de grupamentos carboxilas (Parshetti *et al.*, 2014) em todas as amostras, com exceção da amostra BPM250, onde a pirólise foi incompleta, como mostrou a Figura 7. Bandas na região $860\text{ e }620\text{ cm}^{-1}$ indicam, respectivamente, a presença de óxido de silício nas amostras BPM700 e BPM800, associados às cinzas e aos esqueletos aromáticos (Reddy *et al.*, 2005; Musumeci *et al.*, 2007; Figueredo *et al.*, 2017).

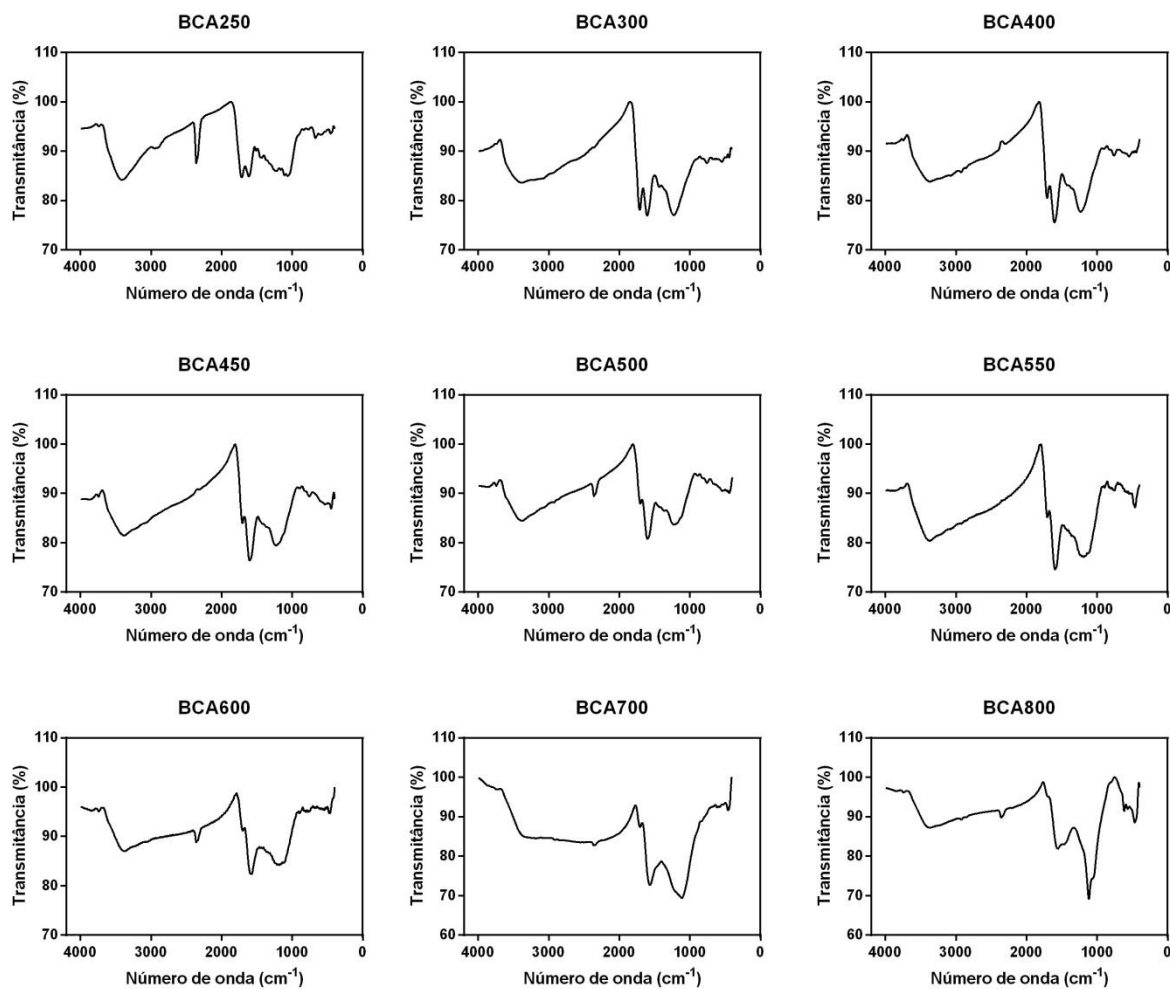
Tabela 2 – Principais bandas presentes nos *biochars* produzidos a partir de BMPM.

	Temperatura de Pirólise (°C)									Grupos Funcionais
	250	300	400	450	500	550	600	700	800	
Número de Onda (cm ⁻¹)			3755							Estiramento –OH (Si-OH)
	3471	3410	3411							Deformação axial de –OH; caracterizam funções fenólicas
				3363	3363	3364	3286			Deformação axial de –OH ou NH; caracterizam funções fenólicas e aminas primárias, respectivamente
							3166	3166	3193	Estiramento de aminas secundárias –R ₂ NH
	2962	2881								Deformação axial de –CH, assinatura de aldeídos
						2321		2306	2310	Vibrações de estiramento da ligação C-H assimétricas e simétricas para grupos alifáticos
	1731									Vibração de grupamentos carbonilas R ₂ C=O
	1639	1650	1654	1662	1666					Absorção de grupos carbonilas do aldeído
		1577	1558	1558	1550	1553	1546			Vibração angular fora do plano da ligação C–H de aromáticos
	1454							1430	1461	Absorção da ligação –CH angular fora do plano; indicação de compostos aromáticos
		1361	1319	1349	1353	1373	1365	1392	1392	Vibração angular no plano da ligação –OH
	1272	1203	1187							Estiramento axial da ligação –CO de compostos fenólicos
	1079			1079	1076	1064	1160	1014	1029	Estiramento de silicatos, polissacarídeos e vibrações de compostos fosfato
								860	860	Indicador da presença de Si ₂ O
		721	717	709	732	748	748	771	755	Indicador da presença de esqueletos aromáticos
	640							674		Indicador da presença de esqueletos aromáticos

Fonte: Autoria Própria

A Figura 15 mostra os espectros de FTIR obtidos para os *biochars* produzidos a partir de BMCA e a Tabela 3 indica as principais bandas dos grupos funcionais encontrados. Na região de 3690-3670 cm^{-1} foram encontradas bandas que indicam a presença de compostos contendo silício devido ao estiramento assimétrico dos grupos Si-O-Si e Si-O-C e silanol, Si-O-H, respectivamente (Barbosa, 2007), que não desapareceram com o aumento da temperatura de pirólise. Na região de 3300 cm^{-1} foram encontradas bandas que estão relacionadas com as deformações axiais de grupos fenólicos e de aminas primárias (Jindo *et al.*, 2014) que não estavam presentes nas amostras de *biochar* produzidos a partir de BPM, indicando a influência da biomassa de origem nos grupamentos superficiais mesmo com a evolução do rearranjo estrutural provocado pelo aumento da temperatura de pirólise. Os *biochars* BCA400, BCA450 e BCA500 apresentaram bandas de estiramento axial da ligação -CH, que é caracterizada como assinatura da butanona, indicando, entre outras características, compostos inflamáveis (Chia *et al.*, 2012). O BCA240 apresentou uma banda em 1214 cm^{-1} que é característica de compostos fenólicos que podem conferir caráter hidrofóbico a esse material (Mimmo *et al.*, 2014a). Já na região de 700-600 cm^{-1} , amostras de 250 a 550 °C apresentaram menos bandas indicativas de esqueletos aromáticos quando comparadas às amostras produzidas a partir de BMPM. Em geral, os espectros apresentam um aumento na intensidade e largura das bandas, bem como deslocamento do comprimento de onda. Isto ocorre devido ao avanço das modificações superficiais causadas pela pirólise (Keiluweit *et al.*, 2010b) (Mimmo *et al.*, 2014a).

Figura 15 – Espectros de FTIR para *biochars* produzidos a partir de BMCA.



Fonte: Autoria própria

Tabela 3 – Principais bandas presentes nos *biochars* produzidos a partir de BMCA.

	Temperatura de Pirólise (°C)									Grupos Funcionais
	250	300	400	450	500	550	600	700	800	
Número de Onda (cm ⁻¹)	3671		3679	3721	3702	3710	3687		3698	Estiramento –OH (Si-OH)
	3378	3343	3332	3343	3343	3343	3343	3343	3343	Deformação axial de –OH ou NH; caracterizam funções fenólicas e aminas primárias, respectivamente
			3016	3008	3016					Estiramento axial da ligação –CH, geralmente assinatura da butanona
	2884		2850		2858				2884	Deformação axial de –CH, assinatura de aldeídos
					2329		2325	2287	2318	Vibrações de estiramento da ligação C-H assimétricas e simétricas para grupos alifáticos
	1693	1697	1689	1654	1658	1662	1662	1654	1666	Absorção de grupos carbonilas do aldeído
	1585	1581	1577	1577	1573	1569	1558		1523	Vibração angular fora do plano da ligação C–H de aromáticos
									1423	Absorção da ligação –CH angular fora do plano; indicação de compostos aromáticos
	1392	1392	1384		1346					Vibração angular no plano da ligação –OH
	1214									Estiramento axial da ligação –CO de compostos fenólicos
		1187	1195	1195	1195	1149	1149		1106	Estiramento axial da ligação –CO de compostos fenólicos
	1056							1083	1041	Estiramento de silicatos, polissacarídeos e vibrações de compostos fosfato
		728	740	721	701					Indicador da presença de esqueletos aromáticos
	636									Indicador da presença de esqueletos aromáticos

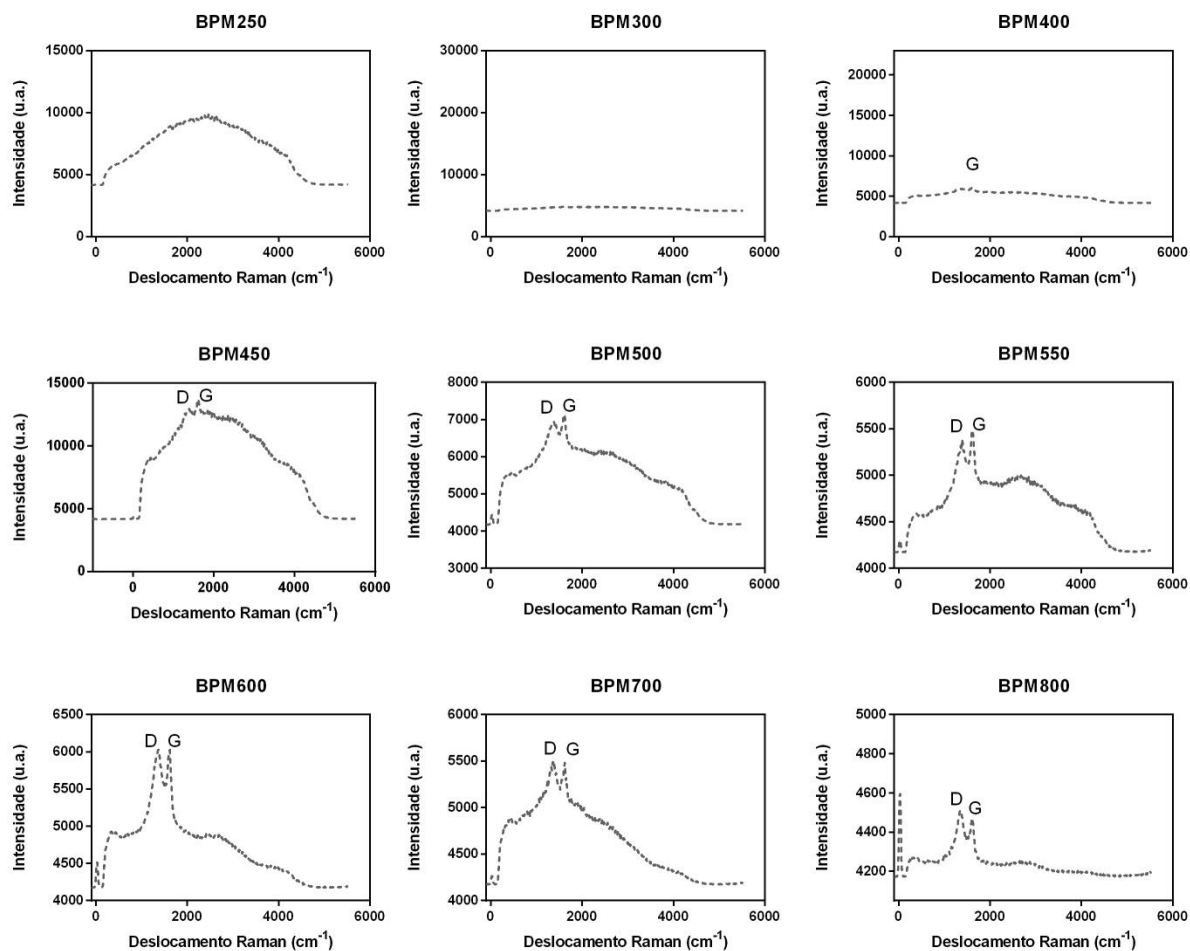
Fonte: Autoria Própria

Complementarmente, as análises de espectros RAMAN visou identificar os tipos de ligações presentes nas amostras de biomassa de origem e *biochars*, fornecendo assim, informações sobre o grau de desordem da rede cristalina. A espectroscopia RAMAN para amostras de *biochar* é feita por meio da análise das bandas D e G, normalmente encontradas a 1350 cm⁻¹ e 1580 cm⁻¹ e, respectivamente, e são evidências de hidrocarbonetos poliaromáticos e estruturas de grafite (Guerrero *et al.*, 2008). A banda G representa vibrações de átomos de

carbono sp^2 encontradas em grafite e ligações duplas de carbono. Já a banda D está ligada aos modos de vibração de anéis de grafite desordenados (Chia *et al.*, 2012). A Figura 16 mostra os espectros de RAMAN para os *biochars* de BMPM. As amostras de baixa temperatura de pirólise (250 e 300 °C) mostram fluorescência, e, portanto, estas não apresentam sinais para as bandas D e G provavelmente porque estruturas de grafite microcristalino não foram gerados e, dessa forma, não puderam induzir a dispersão não elástica de fótons incidentes (Li *et al.*, 2006). Ou seja, os *biochars* BPM250 e BPM300 não apresentaram sinais bem definidos devido à fluorescência para a frequência utilizada nas análises. Este fato reflete que as três amostras são constituídas de material amorfo e desordenadas (poliamorfismo), não apresentando, ainda, os picos característicos de materiais carbonáceos.

A partir do espectro da amostra BPM400, nota-se um aumento da intensidade da banda G e, posteriormente para as maiores temperaturas de produção o aumento da intensidade das bandas D e G. Nenhum dos materiais apresentaram bandas 2D. A banda 2D é uma banda de segunda ordem harmônica da banda D, geralmente presente entre 2450 e 2650 cm^{-1} . Sem a presença dessas bandas, não é possível concluir o cálculo da distância interplanar entre as camadas de grafite das amostras.

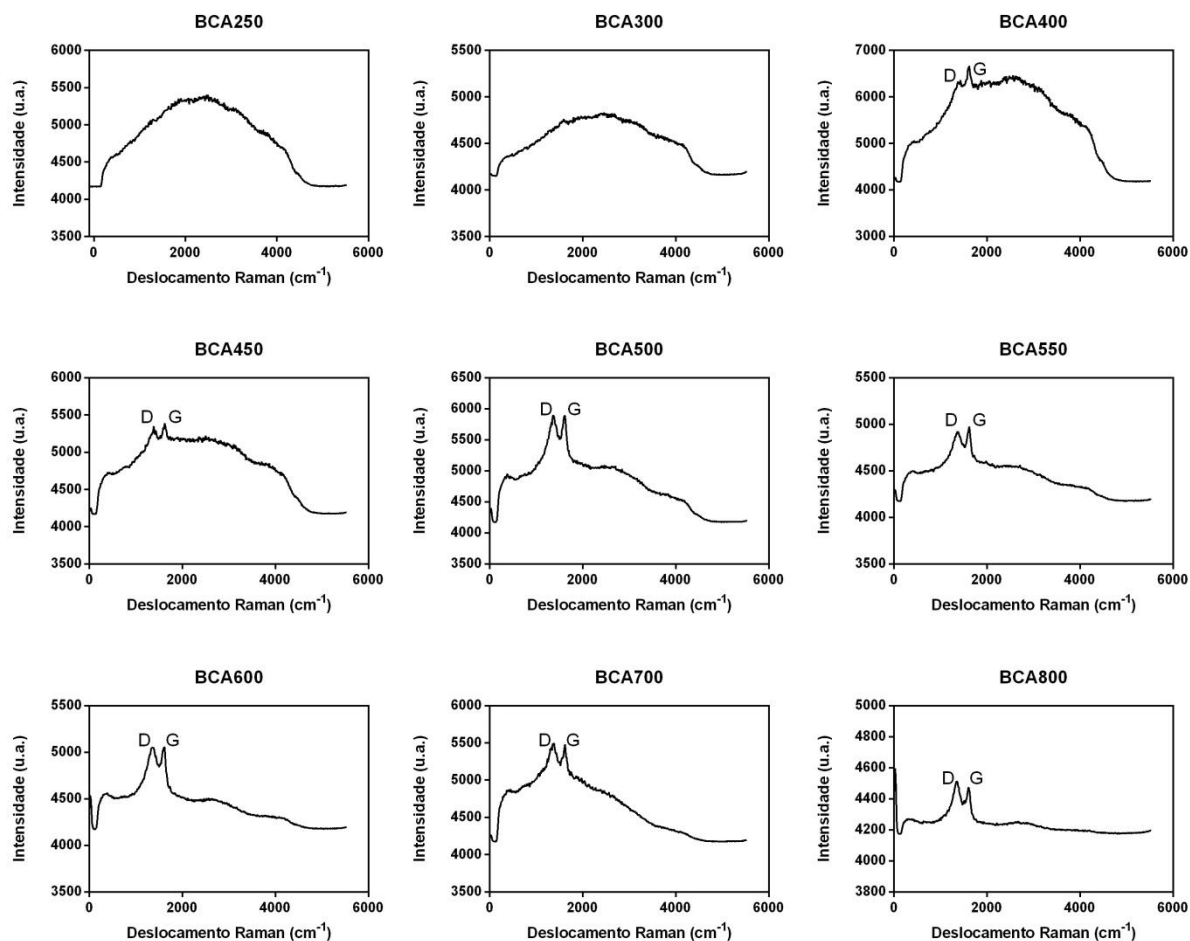
Figura 16 – Espectros de FTIR para *biochars* produzidos a partir de BMPM.



Fonte: Autoria Própria

De modo geral, as amostras de *biochars* produzidas a partir do bagaço de cana-de-açúcar apresentam o mesmo comportamento das amostras de BMPM. O BCA300 indicou a presença de anéis de grafite desordenados e, portanto, uma diminuição da porção amorfa em uma temperatura de pirólise mais baixa quando comparado às amostras de *biochars* de BMPM.

Figura 17 – Espectros de FTIR para *biochars* produzidos a partir de BMCA.



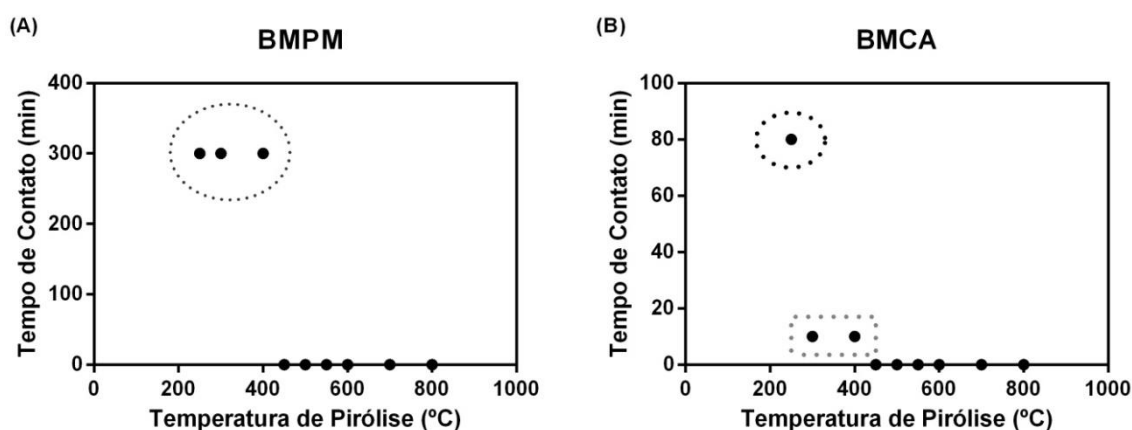
Fonte: Autoria Própria

3.6 Análise de Molhabilidade

Compreender a retenção/ captação de água em amostras *biochars* é fundamental para produzir produtos com qualidade agrônômica eficaz. A absorção de água em meios porosos depende das forças de capilaridade, cujas quais podem permitir ou impedir a entrada de água nos poros dos *biochars*. Esta força capilar que age em sistemas aquosos+*biochar* depende da química da superfície e as propriedades físicas dos meios de comunicação entre as fases (Gray *et al.*, 2014).

As amostras de biomassas BMPM e BMCA apresentaram comportamento de repelência não significativa, visto que a gota de água se espalhou em menos de 1 minuto na superfície. Já as amostras BPM250, BPM300 e BPM400 apresentaram elevada repelência de água, mantendo a gota formada por 5 horas, quando o experimento foi finalizado, como mostra a Figura 18. Já os *biochars* produzidos a partir de BCA, a repelência foi observada em menor intensidade, sendo que o BCA250 manteve a gota de água formada por 90 minutos, enquanto o BCA300 e BCA400 mantiveram a gota por, aproximadamente, 18 minutos. Esses dados sugerem que *biochars* produzidos em baixas temperaturas de pirólise apresentam baixa oxidação superficial e, portanto, apresentam uma característica de sorver moléculas hidrofóbicas, como, por exemplo, contaminantes orgânicos. Da mesma forma, essas superfícies hidrofóbicas podem limitar a capacidade destes materiais de armazenar água quando adicionados ao solo até suas superfícies serem oxidadas por meio de interações com microrganismos do solo e compostos oxidativos (Joseph, Camps-Arbestain, *et al.*, 2010). Assume-se, portanto, que formas orgânicas hidrofóbicas de nutrientes também podem ser sorvidas nas partículas de *biochar* com baixa oxidação superficial. Contudo, este fato pode efetivamente reduzir a área de superfície dos *biochars* na escala molecular por meio de impedimento estérico, bloqueando assim, a adsorção subsequente direta de moléculas de nutrientes orgânicos e inorgânicos.

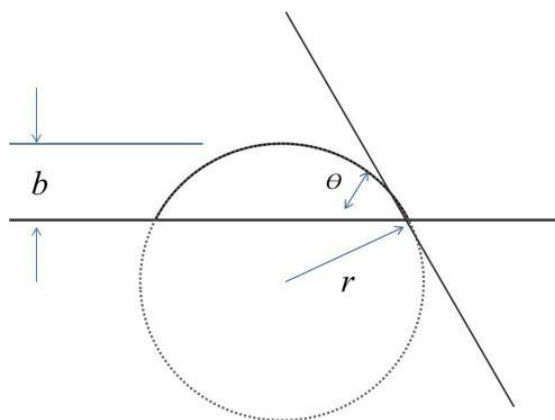
Figura 18 – Análise de repelência de água. Em destaque, as amostras hidrofóbicas (A) BPM250, BPM300 e BPM400 e; (B) BCA250, BCA300 e BCA400, nas quais foi possível realizar as análises de molhabilidade.



Fonte: Autoria Própria

Visto que apenas as seis amostras de *biochar* de BPM e BCA apresentaram hidrofobicidade, as mesmas foram submetidas a uma análise de molhabilidade via aferição do ângulo de contato. As forças coesivas da água tendem a formar uma gota esférica, já as forças adesivas entre o sólido e o líquido tendem a espalhar o líquido sobre o sólido, assim o ângulo de contato é determinado pela competição entre estas duas forças. Geometricamente, o ângulo de contato é caracterizado pelo ângulo que se forma pela intersecção dos planos tangentes entre as superfícies do líquido e do sólido, bem como o contorno de contato entre as duas fases e a fase circundante (geralmente ar ou vapor), como mostra a Figura 19.

Figura 19 - Ilustração da medida de ângulo de contato que fornece dados do tipo de interação molecular entre o líquido depositado e o sólido analisado.



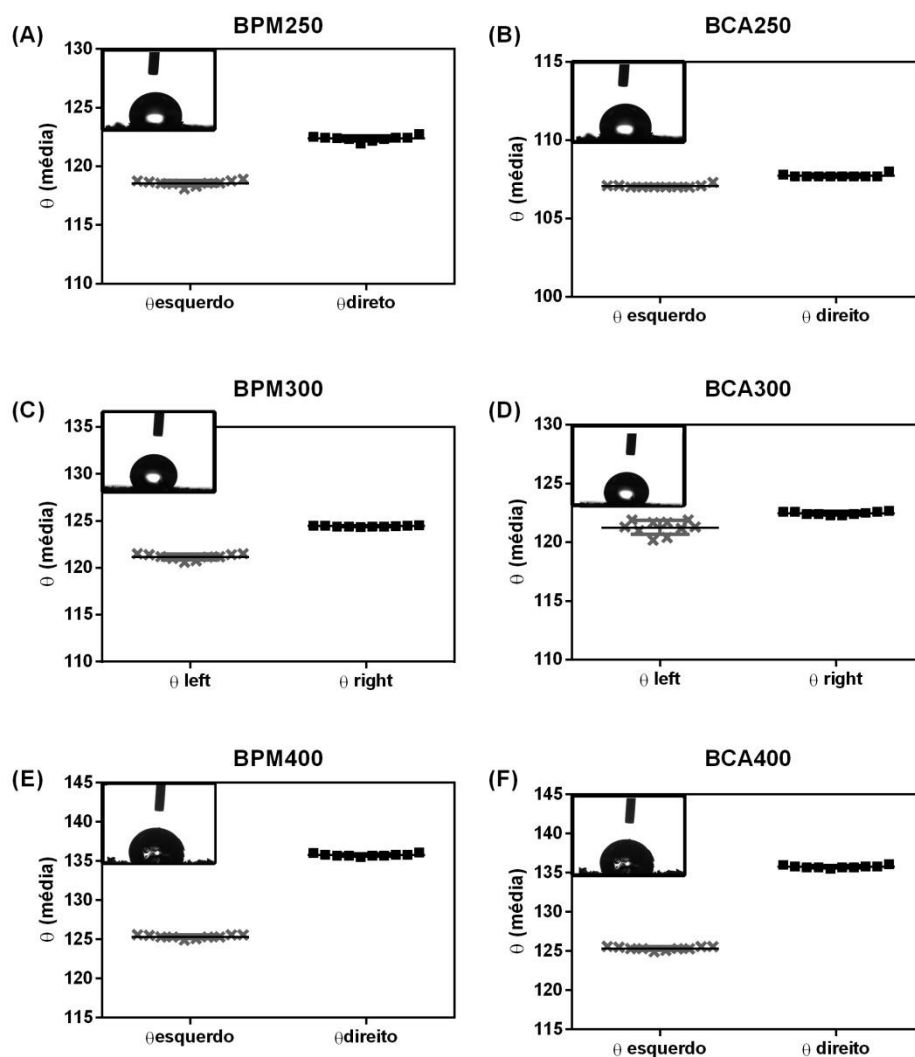
Fonte: Autoria própria

Valores baixos de θ indicam que o líquido espalha, ou molha, bem como altos valores indicam pouca molhabilidade. Mais especificamente, esta técnica quantifica a facilidade que uma superfície tem de realizar ligações de hidrogênio. Os valores do ângulo de contato seguem a seguinte classificação (Silverstein, 1993):

- $\theta = 0$ a superfície é altamente hidrofílica
- $\theta < 90^\circ$ a superfície é hidrofílica
- $\theta \geq 90^\circ$ a superfície é hidrofóbica
- $\theta > 160^\circ$ são super hidrofóbicas

A Figura 20 mostra respectivamente as análises para as amostras BPM250, BPM300, BPM400, BCA250, BCA300 e BCA400, onde os ângulos de contato da direita e esquerda da gota são, na maioria das vezes, diferenciados. Isto ocorre, pois os principais fatores que podem afetar o comportamento de molhabilidade de um sólido por um líquido são rugosidade, heterogeneidade da superfície do substrato e reações entre líquido e o sólido, fatores estes intrínsecos para as amostras de *biochars* analisadas. Em outras palavras, as superfícies dos *biochars* analisados não são planas (por estarem na forma pulverizada/ particulada) e são quimicamente heterogêneas. Por conta dessas características inerentes aos materiais, alterações locais nas energias superficiais foram verificadas, proporcionando a obtenção de valores de ângulo de contato diferentes de uma condição de equilíbrio para o lado esquerdo e direito.

Figura 20 – Aferição de ângulo de contato com água. Fotografia da gota sobre a superfície do *biochar* e ângulos de contato da água com (A) BPM250; (B) BCA250; (C) BPM300; (D) BCA300; (E) BPM400 e (F) BCA400.



Fonte: Autoria própria

As forças de pressão capilar podem ser positivas ou negativas dependendo das propriedades de superfície: superfícies hidrofílicas com ângulos de contato inferiores a 90° geram pressões capilares positivas, favorecendo a captação de água nos poros. Já em superfícies hidrofóbicas com ângulos de contato superiores a 90° , pressões capilares negativas são geradas, impedindo a entrada de água nos poros (Gray *et al.*, 2014). Neste sentido, é evidente que os ângulos de contato para as amostras BPM/ BCA250, BPM/ BCA300 e BPM/ BCA400 são

superiores à $\theta > 160^\circ$, sendo, portanto, materiais carbonáceos super hidrofóbicos. Esses dados corroboram com os dados obtidos nas análises de FTIR, onde essas mesmas amostras apresentam bandas de grupamentos fenólicos que conferem caráter hidrofóbico a esses *biochars*. Já as amostras BPM/ BCA450, BPM/ BCA 500, BPM/ BCA550, BPM/ BCA600, BPM/ BCA700 e BPM/ BCA800 apresentaram ângulos de contato $\theta = 0$, favorecendo a captação de água de água nas amostras, sendo, portanto, altamente hidrofílicas.

Por fim, as análises de molhabilidade e ângulo de contato mostraram possíveis efeitos dos *biochars* produzidos no que tange às suas características de adsorção e interferência na lixiviação (ou retenção) de nutrientes. Dados dessa natureza são úteis para o gerenciamento de nutrição das plantas nos testes de campo, bem como avaliar os impactos provenientes da utilização dos *biochars* como condicionante e fertilizante de solos. Em adição, a natureza hidrofóbica das amostras BPM250, BPM300 e BPM400 as tornam materiais ideais para a sorção de compostos orgânicos hidrofóbicos (Lua *et al.*, 2004), fato bastante útil para sua utilização para descontaminação de solos, por exemplo.

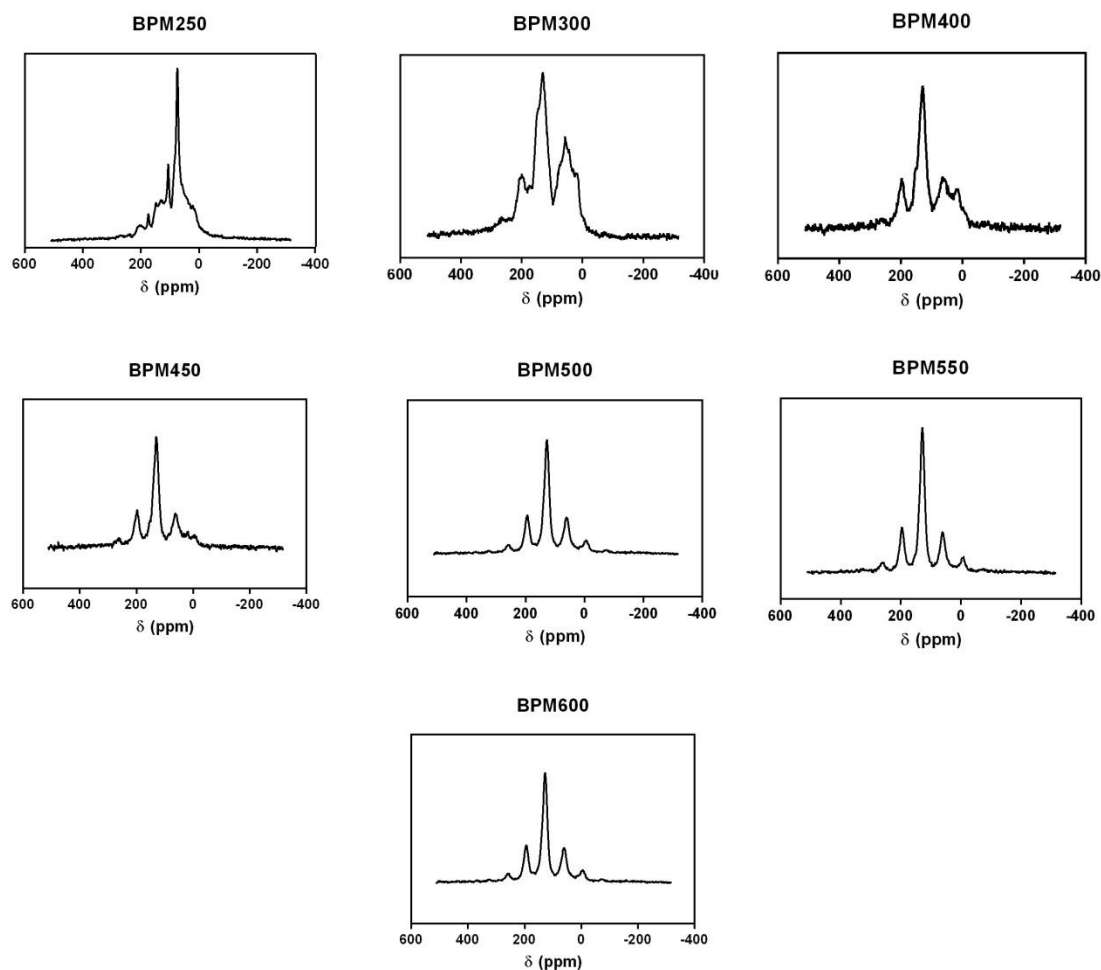
Em geral, notou-se que hidrofobicidade nos *biochars* produzidos neste trabalho diminuiu com o aumento da temperatura de pirólise, uma vez que a funcionalidade alifática é volatilizada e perdida em temperaturas de produção mais elevados (Gray *et al.*, 2014).

3.7 RMN ^{13}C

As mudanças que ocorrem durante o processo de pirólise e afetam o tipo e distribuições das principais moléculas de carbono presentes nos *biochars* foram exploradas por meio de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^{13}C). Os espectros de RMN ^{13}C para os *biochars* produzidos a partir de BMPM (Figura 21) mostram principais sinais em 20, 65 130 e 200 ppm, como indica a Tabela 4. Picos na região de 20 ppm são encontrados para as amostras BPM250, BPM300, BPM400 e BPM450 e são indicativos de grupos acetila da hemicelulose (Alho *et al.*, 2013). Esses grupos identificados nessas amostras se encontram na parede celular das plantas e estão associados à lignina, pois formam uma matriz que envolve a celulose em cadeias amorfas (Araújo, 2015). Esses dados corroboram com encontrados nas análises de pH, COD, Boehm, FTIR, RAMAN e de molhabilidade, visto que a lignina é uma macromolécula hidrofóbica. Além disso, este sinal indica que após a quebra via decomposição térmica (aumento

da temperatura de pirólise) dessas moléculas a distribuição dos principais grupos que constituem os *biochars* não sofrem grandes modificações, ou seja, suas estruturas tornam-se cada vez mais semelhantes, independente da temperatura de pirólise. Esta conclusão é consistente com um modelo de evolução de char, o qual estipula que as diferenças na composição química dos *biochars* são perdidas durante um estágio de transição inicial, mas as diferenças na estrutura física permanecem nos estágios posteriores (Keiluweit *et al.*, 2010a). Esta informação é útil, pois pode auxiliar na diminuição de *input* de energia térmica para a fabricação de *biochar*, o tornando economicamente atrativo. Todas os *biochars* BPM apresentaram sinal em 200 ppm. Sinal nesta região indica a presença de cetonas (Mcbeath *et al.*, 2014), que conferem caráter básico e caráter de estabilidade ao material, aumentando sua recalcitrância visto que não se oxidam de forma fácil.

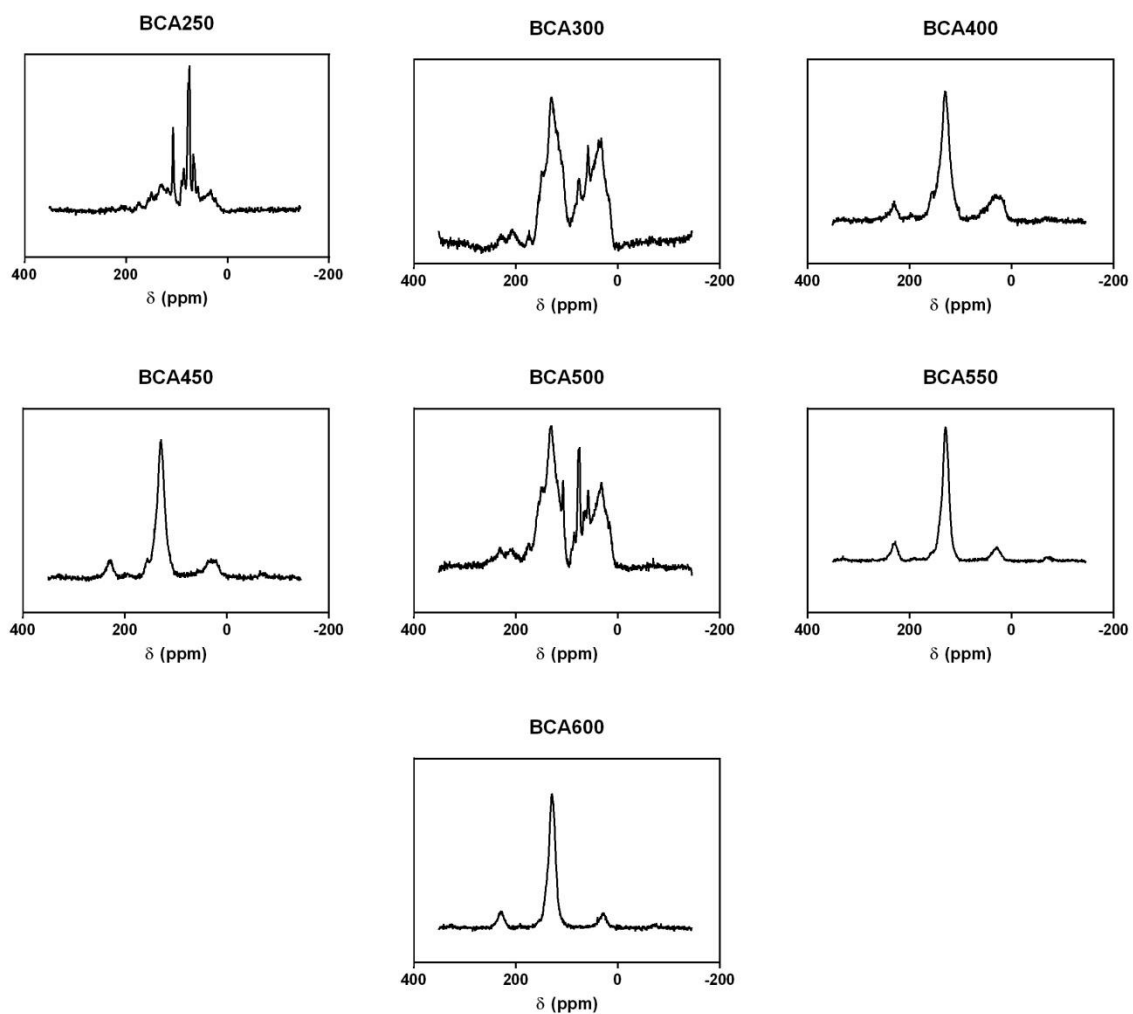
Figura 21 – Espectros de RMN ^{13}C para as amostras de *biochars* BPM.



Fonte: Autoria própria

Já os espectros de RMN ^{13}C das amostras de *biochar* produzidos a partir do bagaço de cana-de-açúcar indicam, por uma comparação direta, que a composição química dos *biochars* depende diretamente da biomassa de origem. As assinaturas principais encontradas para as amostras de BCA foram os sinais em 38, 130 e 158 ppm. O sinal 158 ppm é associado ao carbono aromático presente na lignina (Alho *et al.*, 2013), principalmente de unidades siringila, que demonstra que mesmo com o aumento da temperatura de pirólise, a parede celular da lignina não foi decomposta até alcançar 600 °C. De uma forma geral, os grupos de carbono dos *biochars* de BCA possuem menos sinais dos grupos de carbono.

Figura 22 – Espectros de RMN ^{13}C para as amostras de *biochars* BCA.



Fonte: Autoria própria

Tabela 4 – Principais sinais encontrados nos espectros de RMN ^{13}C para os *biochars* produzidos a partir de BPM e BMCA.

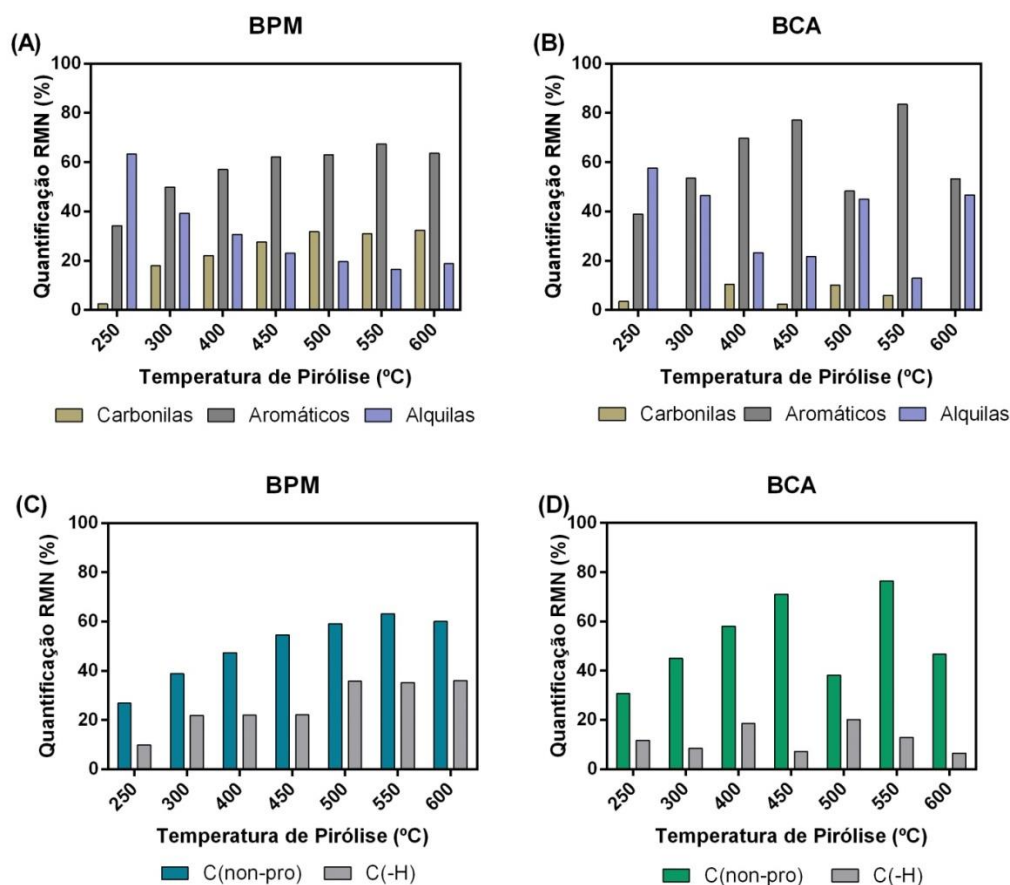
	Temperatura de Pirólise (°C)														Grupos de Carbono
	BPM							BCA							
	250	300	400	450	500	550	600	250	300	400	450	500	550	600	
δ (ppm)					5	5	5								Carbono aromático
	20	20	20	20											Grupos acetil metil – hemicelulose
								38	38	38	38	38	38	38	Grupos Acetila
		60						62	61			61			Porção amorfa da celulose
			65	65	65	65	65								Porção cristalina da celulose
	78							75	75			75			Grupos carboxílicos presentes na hemicelulose
								90				90			Grupos alcanos
	107							107				117			Celulose
	130	130	130	130	130	130	130	130	130	130	130	130	130	130	Estruturas aromáticas
	150	150	150					158	158	158	158	158	158		Carbono aromático presentes na lignina (unidades siringila)
	176	180						183	178						Grupos carboxílicos presentes na hemicelulose
	207	203	200	201	200	200	200		214	202		214			Estruturas de cetona
									233	233	233	233	233	233	Carbono aromático

Fonte: Autoria Própria

Por meio da integração da área dos picos obtidos nos espectros de RMN ^{13}C , pode-se obter a distribuição dos principais grupos de carbono presentes nas amostras de *biochar*. Para as amostras de BPM, o aumento dos grupos carbonila e aromáticos se deram de forma crescente, enquanto que para os grupos alquilas se deu de forma decrescente. Ou seja, as mudanças dos teores de carbono foram acontecendo gradualmente, de acordo com as temperaturas de pirólise. Os três grupos de carbono avaliados, carbonilas, aromáticos e alquilas, foram observados em todas as amostras.

Para os *biochars* de BCA essas mudanças não apresentaram correlação direta com o aumento da temperatura de pirólise, indicando que o grupo botânico exerce maior influência na evolução estrutural dos grupos de carbono. Ou seja, esses dados indicam que a composição da biomassa de origem afeta a composição dos *biochars*, principalmente na distribuição dos grupos de carbono. Os três grupos de carbono avaliados, carbonilas, aromáticos e alquilas, não foram observados em todas as amostras, havendo predomínio de grupos aromáticos e alquilas (ramificações do benzeno).

Figura 23 – Análise de grupos de carbono por RMN ^{13}C . Distribuição de grupos de carbonos nas amostras de *biochar* de (A) BPM e (B) BCA; Determinação dos tipos das porções de carbono aromático para (C) BPM e (D) BCA.



Fonte: Autoria própria

3.8 Área Superficial – BET

Existe uma necessidade de explorar as propriedades físicas que determinam o modo como o *biochar* interage no ambiente. Uma dessas propriedades físicas é a porosidade, área superficial e volume dos microporos formados durante o processo de pirólise. Esses dados fornecem informações sobre o modo de como o *biochar* interage com a água para modificar os processos hidrológicos do solo, como, por exemplo, a capacidade de retenção de água disponível nas plantas (Brockhoff *et al.*, 2010). Da mesma forma, as propriedades físicas afetam diretamente os serviços ecológicos que o material pedológico *biochar* pode fornecer como, por exemplo, espaço para a colonização de microorganismos (Warnock *et al.*, 2007) e, posteriormente, afetando a acessibilidade de substratos e nutrientes em importantes ciclos biogeoquímicos mediados por estes microorganismos do solo (Brewer *et al.*, 2014).

Sendo assim, os resultados da análise de área superficial e volume de microporos obtidos via análise BET para os *biochars* feitos a partir de BMPM e BMCA são indicados na Tabela 5. A área específica superficial dos *biochars* BPM aumentou com o aumento da temperatura de pirólise, variando $370,0 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. A mesma tendência de comportamento foi observada para as outras variáveis investigadas. Este fenômeno pode ser generalizado e correlacionado com a temperatura de pirólise, pois à medida que esta aumenta as substâncias (como a matéria volátil, por exemplo) que podem bloquear os poros são expulsas ou são decompostas termicamente, aumentando assim a área de superfície acessível externamente (Angin, 2013; Rafiq *et al.*, 2016). Quando se comparam os valores entre ambas as biomassas, nota-se que a área superficial é relativamente baixa para o *biochar* de BPM e isto ocorre provavelmente devido à maior presença de material inorgânico na biomassa de origem que preenche parcialmente ou bloqueia os microporos (Rafiq *et al.*, 2016), indicando o tipo de influência que a matéria-prima para a produção de *biochar* pode resultar no material final.

Tabela 5 – Área específica superficial e propriedades dos poros para os *biochars* produzidos a partir de BMPM e BMCA. Células com – indicam valores não quantificáveis.

Amostras desgaseificadas a 110 °C em vácuo	BET					
	Área Específica Superficial (m ² g ⁻¹)	Superfície Total (m ² g ⁻¹)	Superfície Microporosa (m ² g ⁻¹)	Superfície Externa (m ² g ⁻¹)	Volume Microporos Gasoso (cm ³ g ⁻¹)	Volume Microporos Líquido (cm ³ g ⁻¹)
BPM250	0,5 ± 0,5	0,5	0,1	0,4	0,02	0,0
BPM300	2,0 ± 1,1	--	--	--	--	--
BPM400	2,6 ± 2,5	28,5	20,8	7,9	4,8	0,01
BPM450	37,1 ± 2,7	39,2	23,5	17,3	5,4	0,01
BPM500	50,5 ± 3,2	50,1	28,2	24,3	6,5	0,01
BPM550	142,7 ± 6,3	137,7	64,3	78,9	14,7	0,02
BPM600	300,6 ± 8,8	319,5	241,9	80,9	55,3	0,09
BCA250	1,7 ± 0,5	1,8	--	1,6	--	--
BCA300	2,6 ± 1,1	2,2	--	2,2	--	--
BCA400	75,5 ± 10,6	83,6	61,5	21,4	14,10	0,02
BCA450	472,3 ± 2,0	456,5	343,6	39,8	3,1	0,0
BCA500	469,8 ± 1,0	525,4	360,9	45,9	56,3	0,0
BCA550	457,9 ± 8,6	513,2	453,2	50,7	103,7	0,16
BCA600	440,4 ± 9,2	473,7	336,8	74,0	91,9	0,14

Fonte: Autoria própria

Para as amostras de *biochars* produzidas a partir de BCA, nota-se a mesma tendência de aumento nos valores das variáveis analisadas com o aumento da temperatura de pirólise. Entretanto, de 400 para 450 °C a área específica superficial aumentou significativamente em aproximadamente 400 m² g⁻¹; porém, observa-se também que a partir de 500 °C a mesma variável começa apresentar um comportamento decrescente para esta mesma variável. Isto ocorre provavelmente devido à reestruturação das estruturas do *biochar*, via fusão dos grupos de carbono causada por temperaturas mais elevadas, dado este que corrobora com a diminuição do rendimento de produção destes mesmos *biochars*.

Uma maior área específica superficial sugere uma área maior no *biochar* passível de colonização para microorganismos e, da mesma forma, caso haja substâncias tóxicas na estrutura porosa, uma maior área de interação com esses mesmos microorganismos também é aumentada, induzindo à toxicidade, podendo, portanto, alterar a composição microbiológica do solo (Schimmelpfennig e Glaser, 2012). Quando a superfície externa é analisada, nota-se um comportamento crescente dos valores encontrados, aumentando conforme a temperatura de pirólise. Essa variável fornece informações sobre o primeiro contato do *biochar* com o ambiente: ela indica os sítios que estarão prontamente disponíveis para realizar trocas iônicas, processos de

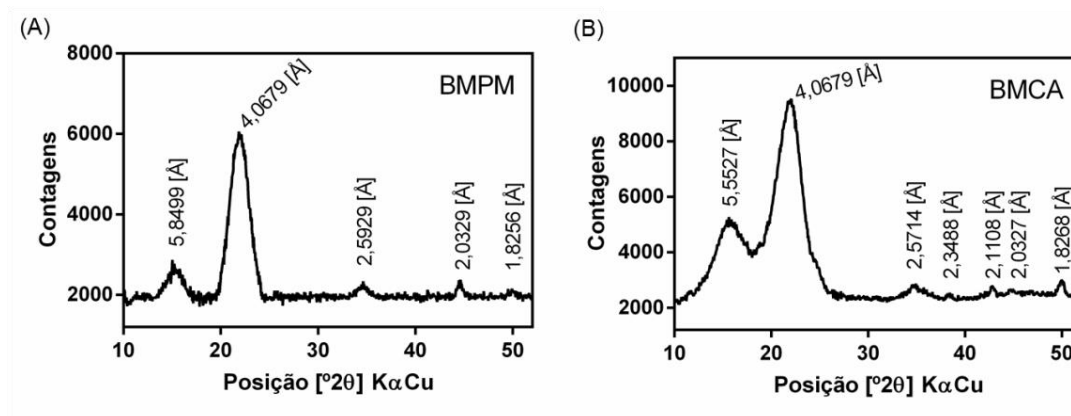
adsorção e reatividade, pois indica somente os sítios de troca presentes na superfície da partícula de *biochar*. Esses sítios afetam as propriedades hidráulicas do material, influenciando a hidrofobicidade sob diferentes condições. Logo, cruzando essa informação com as análises de molhabilidade, as amostras com baixos valores de superfície corroboram com o fato que baixas temperaturas de pirólise produzem materiais hidrofóbicos. E, como resultado, a área de superfície pode indicar o possível efeito da inserção de *biochar* sobre os níveis de umidade no solo. Com baixos valores de área superficial, os BPM250, BPM300, BPM400, BPM450, BCA250 e BCA300 não podem ser utilizados como materiais/ insumos agrícolas que irão ser benéficos para aumentar a capacidade de retenção de água do solo.

3.9 Difrátômetro de Raios-X

As mudanças microestruturais que ocorrem durante a decomposição térmica também podem ser detectadas por difratometria de raios-X (DRX). Uma análise de DRX informa as variações de intensidade de difração de baixo 2θ a alto 2θ . A quantidade de picos de intensidade localizados na extensão 2θ fornecem uma impressão digital dos sólidos cristalinos presentes na amostra sendo, portanto, um método efetivo para avaliar a mudança de cristalinidade da celulose (Rojith e Bright Singh, 2013). Cada pico representa, portanto, um plano cristalográfico específico (Leng, 2008).

Moléculas orgânicas complexas são inerentes à fase amorfa. A Figura 24 mostra a presença de dois picos referentes à celulose (identificação da matriz de cadeias lineares D-glicose) centradas em ~ 15 e 22° para ambas as biomassas, indicando a presença de celulose cristalina.

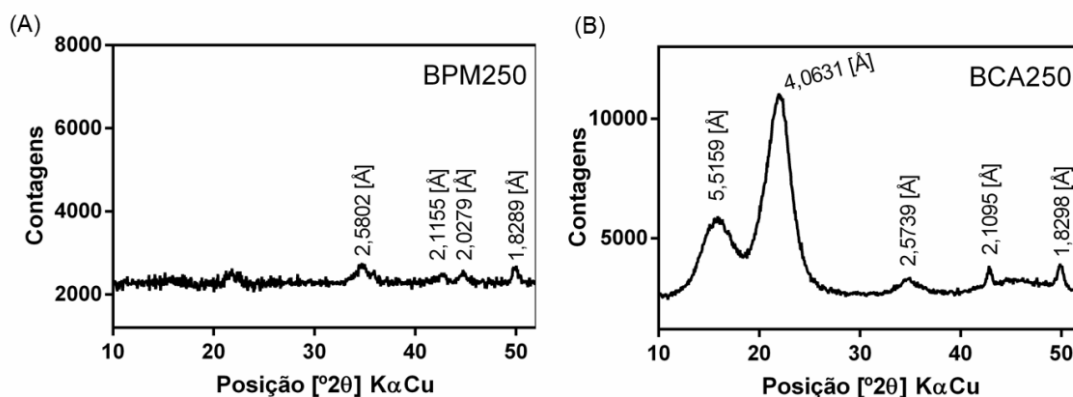
Figura 24 - Padrão de difratograma de pó mostrando a caracterização (A) biomassa de palha de milho (BMPM) e; (B) biomassa de bagaço de cana-de-açúcar (BMCA).



Fonte: Autoria própria

Os mesmos picos em ~15 e 22° ainda podem ser observados, porém com menor intensidade, nas amostras BPM250 (Figura 25A) e BCA250 (Figura 25B), porém com menor intensidade, principalmente para BPM250. À medida que a temperatura de pirólise aumenta os picos de celulose progressivamente perdem a intensidade e tornam-se mais amplos para os *biochars* produzidos a partir de BCA, indicando uma diminuição gradual da cristalinidade da celulose (Keiluweit *et al.*, 2010a) (Figura 27). Porções de carbono amorfo também contribuem para este pico largo observado na amostra BCA250 (Chen *et al.*, 2011). Já para os *biochars* produzidos de BPM, ocorre uma perda completa da estrutura cristalina da celulose, indicada pelo desaparecimento dos sinais, como mostra a Figura 26.

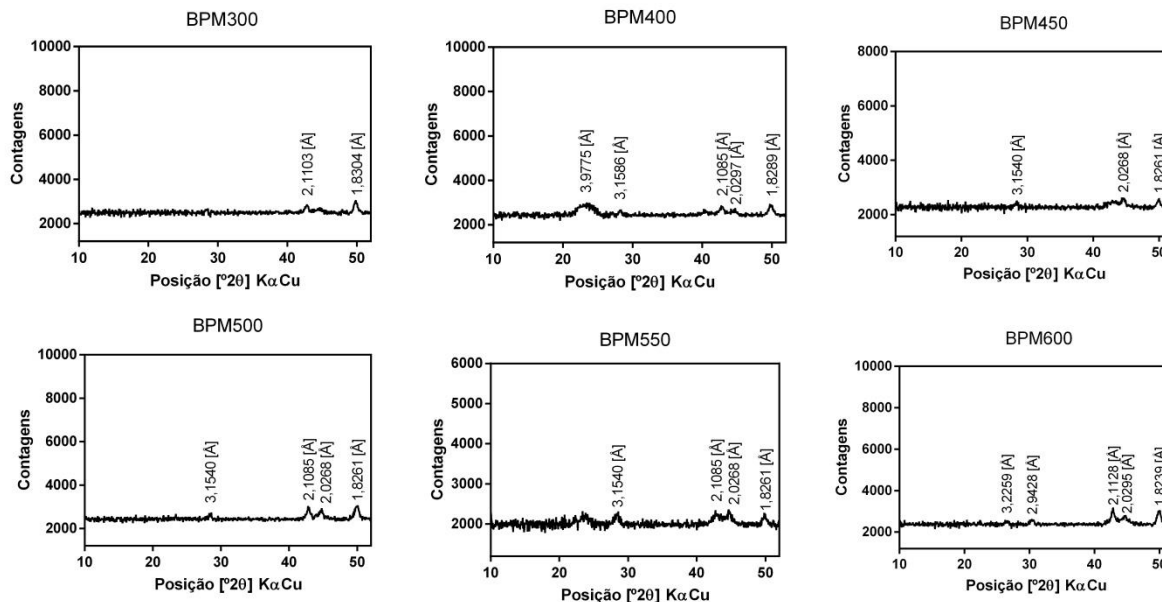
Figura 25. Padrão de difratograma de pó mostrando a caracterização (A) BPM250 e; (B) BCA250.



Fonte: Autoria própria

Tomando como base o padrão de difratometria das biomassas, nota-se que a pirólise induziu transformações químicas nas amostras e, portanto, estruturais. As amostras BPM250, BPM400 e BPM550, BPM700, BPM800 e seus análogos BCA apresentam, como a biomassa parental, traços de sílica amorfa no intervalo de $2\theta = 15$ a 35° (Tarley e Arruda, 2004), corroborando com os dados encontrados em EDS. Neste mesmo intervalo, existe a coexistência de carbono amorfo também.

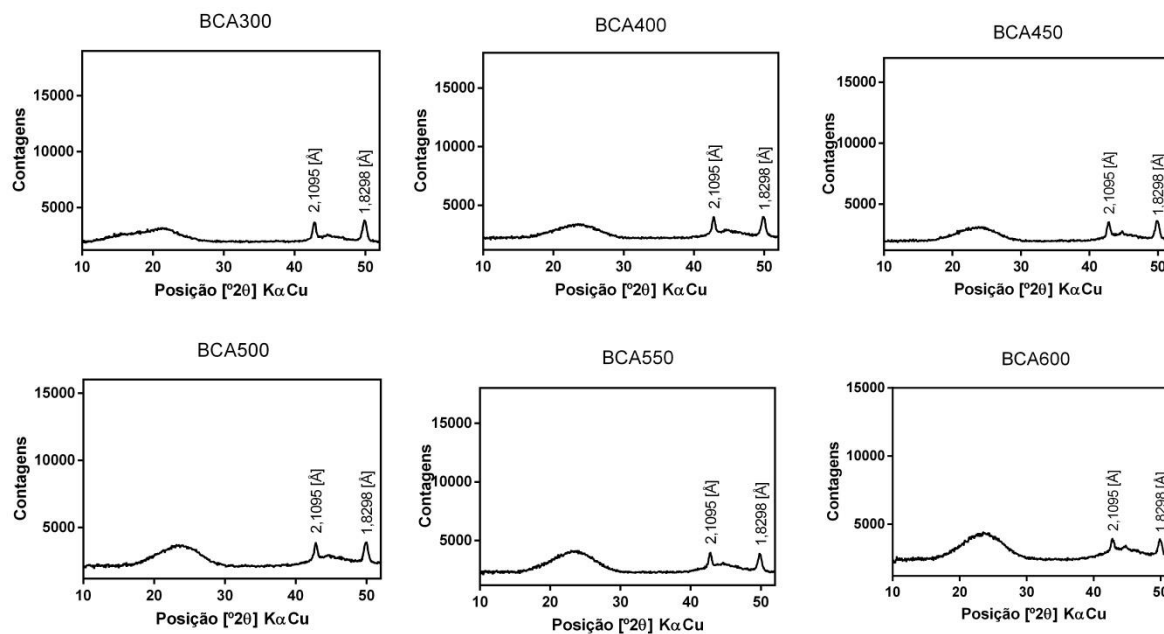
Figura 26. Padrão de difratograma de pó mostrando a caracterização (A) BPM300; (B) BPM400; (C) BPM450; (D) BPM500; (E) BPM550 e; (F) BPM600.



Fonte: Autoria própria

A maioria dos difratogramas de raios-X *biochars* não apresentam mudanças nos planos cristalográficos significativas, sendo os *biochars* de BPM podendo ser considerados como compostos de celulose virtualmente amorfa (Shaaban *et al.*, 2013). Todos *biochars* feitos da palha de milho contém minerais, como fosfato monopotássico (KH_2PO_4), calcita (CaCO_3), bicarbonato de potássio (KHCO_3), pyrocoprite ($\text{K}_2\text{MgO}_7\text{P}_2$) e estruvita ($\text{KMgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). As amostras de BCA ainda apresentam características referentes à presença de perialite ($\text{K}_8\text{Ti}_4\text{Al}_{12}\text{Si}_{24}\text{O}_{72} \cdot 20\text{H}_2\text{O}$) e ferro-manganês. Todo esse conteúdo mineral contém nutrientes essenciais para as plantas, principalmente para aumentar a qualidade pedológica.

Figura 27. Padrão de difratograma de pó mostrando a caracterização (A) BCA300; (B) BCA400; (C) BCA450; (D) BCA500; (E) BCA550 e; (F) BCA600.



Fonte: Autoria própria

Finalmente, pelas análises de DRX é possível perceber que a cristalinidade da celulose é afetada principalmente pelo tipo de biomassa de origem, tendo a temperatura de pirólise um efeito mínimo na decomposição térmica cadeias lineares D-glicose.

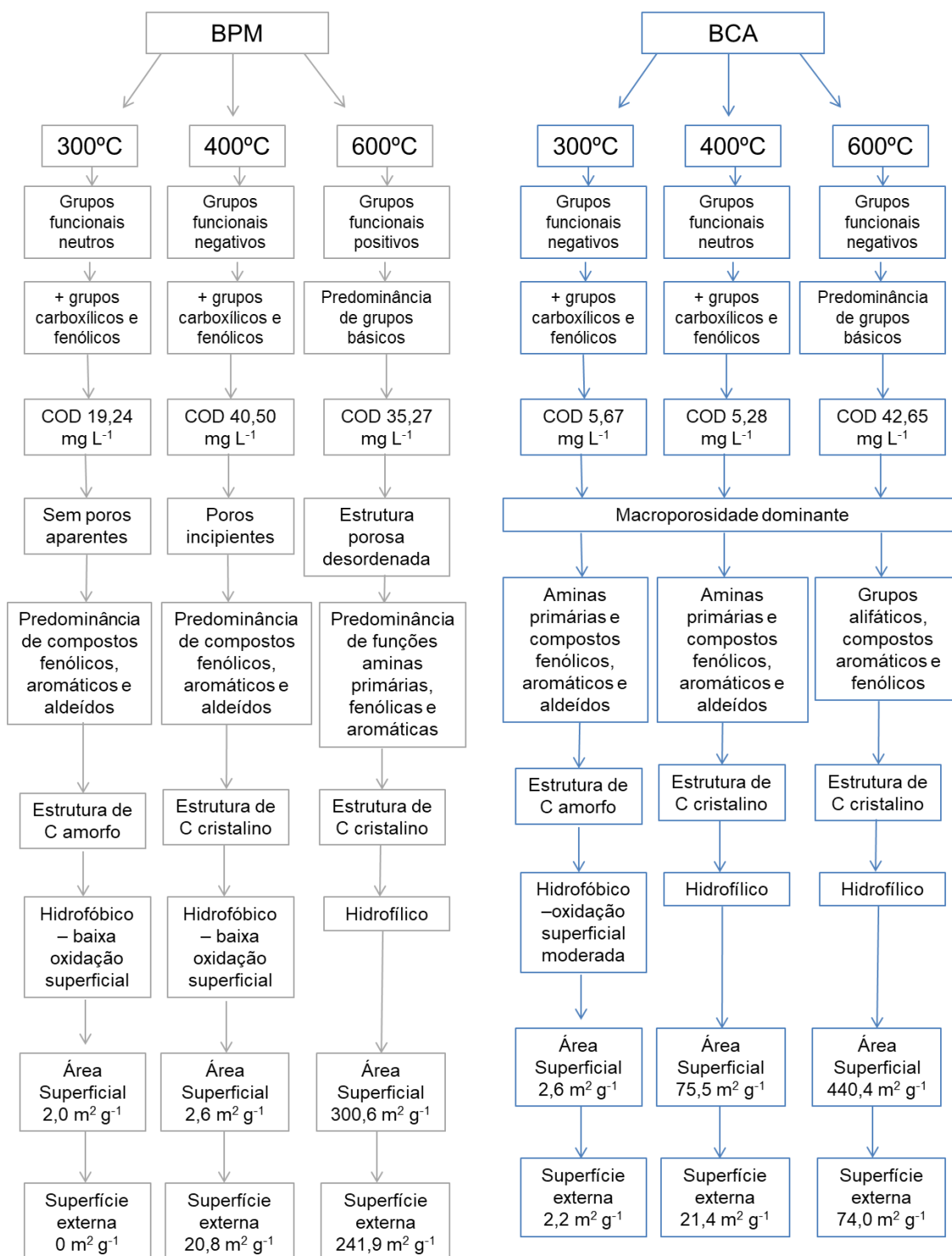
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A gama diversificada das aplicações do *biochar* depende de suas propriedades físico-químicas, que são regidas, principalmente, pelas características da biomassa de origem e do processo de produção (temperatura e duração da pirólise). Logo, levando em conta a influência dessas duas principais características nas análises físico-químicas, podem-se levantar hipóteses sobre o aparecimento de informações sobre o *biochar* e, assim, permitir a definição e seu uso mais adequados.

O *biochar* derivado de temperaturas de pirólise relativamente baixas (300 e 400 °C) é caracterizado por um alto teor de compostos facilmente degradáveis, como material volátil, pois contém baixo teor de carbono recalcitrante, e isso, o que pode suportar o crescimento das plantas (Robertson *et al.*, 2012). Entretanto, as características das espécies orgânicas presentes nessas frações de compostos degradáveis podem incluir químicos possivelmente inibitórios/ tóxicos e até mesmo estimulantes, dependendo dos microorganismos e espécie de sementes utilizadas. Dessa forma, os teores de COD presente nas amostras podem influenciar diretamente, dependendo da dosagem utilizada de *biochar*, na resposta de desenvolvimento e crescimento das espécies de sementes e microorganismos quando em contato com o *biochar*.

Os grupos funcionais presentes na superfície dos *biochars* também são fatores importantes, pois já se sabe que processos de inibição e toxicidade em microorganismos decorrentes da interação com o *biochar* podem ser causados, principalmente, por espécies resultantes da degradação da lignina que são ricas em funcionalidades contendo oxigênio (Aguiar e Ferraz, 2011; Smith *et al.*, 2013). A presença das macromoléculas aromáticas de lignina também confere um caráter hidrofóbico aos *biochars* podendo, assim, influenciar na retenção de nutrientes necessários ao desenvolvimento e crescimento de plantas e microorganismos. A presença da lignina nas amostras de *biochar* de baixas temperaturas de pirólise também é um indicativo à possível resistência ao ataque de uma grande parte dos microorganismos do solo, visto que a função da lignina na estrutura vegetal é conferir a resistência à compressão e a rigidez à parede celular (Menezes e Barreto, 2015).

Figura 28 - Infográfico da escolha das temperaturas de trabalho para a utilização de *biochar*.



Fonte: Autoria própria

Quando se analisa a área superficial e a superfície externa dos *biochars*, nota-se a influência dos efeitos do aumento da temperatura de pirólise na formação da rede de poros. A área superficial, volume dos poros e área de superfície externa aumentam por meio da degradação progressiva dos materiais orgânicos presente nas biomassas de origem, como celulose, hemicelulose e lignina (Kim *et al.*, 2014). O aumento dessas propriedades físicas no *biochar* afeta as suas propriedades hidráulicas e químicas, exercendo influência direta sobre a capacidade de troca e reatividade desse material quando inserido em um ambiente, pois está relacionada com as primeiras reações de interação entre os sítios de troca disponíveis na superfície do *biochar* e os microorganismos e/ ou sistema radicular do solo.

Logo, os *biochars* produzidos em 600 °C, de modo geral, apresentaram características distintas (como esperado) dos produzidos em baixas temperaturas, caracterizando-se principalmente por um aumento das estruturas de poros, conteúdo de carbono aromático e ausência ou pouca matéria volátil. Estas características também são indicativas de uma maior degradação da lignina e ocorrência de reações de condensação aromática (Chen *et al.*, 2012) e podem aumentar a capacidade de adsorção e caráter recalcitrante dos *biochars*, sendo interessante para verificar qual o comportamento dessas amostras frente à captura de nutrientes, por exemplo.

Dessa forma, após a análise de todas as características morfológicas e físico-químicas investigadas neste capítulo e resumidas na Figura 28, optou-se por trabalhar com amostras que apresentassem características distintas entre si para investigar a real influência da temperatura de pirólise nos efeitos que os *biochars* podem causar no sistema solo-microorganismos-planta. Como mostra o infográfico, os *biochars* escolhidos para os experimentos com microorganismos foram os produzidos a 300 e 600 °C. Já para os estudos de germinação foram escolhidos os produzidos a 300, 400 e 600 °C para ambas as biomassas.

CAPÍTULO II

VIABILIDADE MICROBIOLÓGICA: INTERAÇÃO ENTRE *BIOCHARS* E MICROORGANISMOS PEDOLÓGICOS

RESUMO

Estudos realizados sobre caracterizações físico-químicas sobre *biochars* mostram que as análises químicas destes materiais e seus efeitos no crescimento de plantas já não são, por si só, ferramentas satisfatórias para avaliar o risco relacionado à utilização do *biochar* como insumo agrícola. Nesta equação, os microorganismos pedológicos precisam ser levados em conta, pois são determinantes na fertilidade e qualidade da área cultivável. Dessa forma, antes de verificar se o *biochar* quando aplicado ao solo é benéfico às plantas e à produção de biomassa, devem-se verificar quais os possíveis efeitos que este material causa à comunidade de microorganismos pedológicos nativa de uma área. E, neste contexto, este capítulo tem por objetivo abordar quais os efeitos que os *biochars* de palha de sabugo de milho e de bagaço de cana-de-açúcar possuem em cepas específicas de bactérias promotoras do crescimento de plantas *Bacillus aryabhattai* (CMAA-1363 - isolada da rizosfera do cacto mandacaru) e *Leocobacter sp* (CMAA-1422 - isolada de solos de caatinga). O comportamento de fungos ligninolíticos também foi investigado quando colocados na presença de *biochars*. Os testes de viabilidade microbiológica são apresentados neste capítulo como suplementação aos estudos de caracterização físico-química e podem expandir o conhecimento sobre os riscos potenciais da utilização indiscriminada do *biochar*.

Palavras-chave: *biochar*, fungos ligninolíticos, bactérias promotoras do crescimento de plantas, regulação de crescimento

1 INTRODUÇÃO

Bilhões de microorganismos são responsáveis por formar o sistema pedológico. Por meio deles, muitos ciclos biogeoquímicos são mantidos em movimento. Para um solo ser saudável e fértil, o equilíbrio entre as populações de organismos, como fungos e bactérias, precisa ser preservado. Nos últimos anos muitos artigos na literatura científica abordam as questões benéficas do *biochar* quando inseridos no solo como condicionante, fertilizante e até mesmo um meio para remover contaminantes (Ahmad *et al.*, 2014; Mohan *et al.*, 2014; Lau *et al.*, 2017;

Karunanayake *et al.*, 2018). Entretanto, pouco se sabe sobre a existência de comportamentos tóxicos, não somente às plantas, mas aos microorganismos nativos de um solo. Sabe-se também que o *biochar*, atualmente, é um material difícil de ser padronizado, pois características como biomassa de origem, temperatura de produção, porosidade, entre outros, podem modificar inteiramente o comportamento do *biochar* em uma determinada área.

1.1 Bactérias promotoras do crescimento de plantas

O solo é uma estrutura dissipativa e, portanto, só é capaz de funcionar adequadamente por meio das relações não lineares que surgem da interação dos seus elementos: minerais, plantas e microorganismos do solo. Logo, as interações planta-minerais-microorganismos constroem o fluxo de energia e matéria que ocorre no sistema aberto e complexo que é o solo, bem como interferem nos estados de ordem resultantes do não equilíbrio pedológico (Vezzani e Mielniczuk, 2011).

A interação entre bactérias e as raízes das plantas é importante no que tange a sustentação da produtividade, qualidade do solo e fluxo de energia e matéria. Essas relações podem ser benéficas, nocivas ou neutras para o desenvolvimento da planta. Esta interação está relacionada com a espécie, tanto da planta, quanto da bactéria, bem como as condições da termodinâmica pedológica na qual que se encontram. Neste contexto, a utilização de bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCPs) tem sido investigada com mais afinco nas últimas décadas visando, principalmente, por aumentar a produtividade agrícola. Este crescente interesse nas BPCPs tornou os microorganismos endofíticos em novas fontes de moléculas bioativas, visto que são produzidas moléculas químicas resultantes da interação entre as bactérias promotoras do crescimento de plantas e plantas como sinal molecular. Estes sinais moleculares podem influenciar diretamente o desenvolvimento das plantas por intermédio de fito-hormônios, fator Nod, riboflavina, nitrogenase e solubilização de compostos minerais inacessíveis às plantas, por exemplo (Figueiredo *et al.*, 2010).

Dessa forma, as bactérias promotoras do crescimento de plantas têm sido consideradas e desenvolvidas atualmente como fertilizantes naturais, sendo uma alternativa viável aos fertilizantes químicos (Saxena *et al.*, 2013). E um dos maiores desafios tecnológicos e de desenvolvimento industrial é assegurar taxas de sobrevivência dessas espécies (Hale *et al.*, 2015). Neste contexto, o *biochar* tem sido apontado como um material carreador de inóculos BPCPs

justamente por sua estrutura porosa que proporciona espaços para colonização e proteção contra predadores (Ijima *et al.*, 2015).

1.2 Fungos Ligninolíticos

É sabido que as culturas, incluindo a de milho, podem formar associações naturais com diferentes fungos (Zitlalpopoca-Hernandez *et al.*, 2017) que resultam na melhoria do crescimento, nutrição e saúde da planta (Smith e Smith, 2012), bem como na liberação de compostos bioativos no solo, melhorando assim a resiliência biológica do ecossistema do solo por meio de interações multitróficas (Gange *et al.*, 2007; Gehring e Bennett, 2009).

Entre os fungos residentes no solo, os fungos ligninolíticos são importantes para a reciclagem de resíduos lignocelulósicos no solo. Estes fungos, também chamados de fungos da podridão branca, são capazes de liberar enzimas extracelulares de ligninolítica com baixa especificidade de substrato, como as peroxidases de lignina, peroxidases de manganês e lacase (Eriksson *et al.*, 1990). As enzimas produzidas pelos fungos ligninolíticos têm o papel crucial de quebrar as moléculas complexas de lignina e outras matérias-primas vegetais em compostos de baixo peso molecular que podem ser assimilados por raízes e outros microorganismos pedológicos. No entanto, devido à falta de especificidade do substrato, eles também podem degradar outras moléculas recalcitrantes aromáticas, como corantes, poluentes e micotoxinas (Phan e Sabaratnam, 2012; Branà *et al.*, 2017). Poucos estudos estão presentes na literatura sobre a influência do *biochar* sobre o crescimento e atividade de fungos ligninolíticos. Ascough *et al.* (2010) descobriram que cepas de *Pleurotus pulmonarius* e *Coriolus versicolor* poderiam colonizar a estrutura porosa do *biochar*, mas este material não era uma fonte prontamente disponível de nutrientes fúngicos nas condições de seu estudo. Recentemente, García-Delgado *et al.* (2015) estudaram a aplicação combinada de *biochar* e *Pleurotus ostreatus* para descontaminar solos de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e constataram uma produção aumentada de enzimas ligninolíticas na presença de *biochar*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microbiologia – Bactérias

2.1.1 Preparação da suspensão bacteriana para incorporação no sistema *biochar*

A presença e variação do tamanho dos poros presentes nas estruturas dos *biochars* são consideradas como sendo um habitat conveniente para microrganismos diversos (Thies e Riling, 2010). Entretanto, antes de atingir os poros da estrutura do *biochar*, as bactérias e outros microorganismos precisam estabelecer uma ligação com a estrutura molecular da superfície do material. Neste sentido, duas cepas de bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCPs) foram escolhidas para os testes: *Bacillus aryabhatai* (CMAA-1363 - isolada da rizosfera de *Cereus jamacaru* - cacto mandacaru) e *Leocobacter sp* (CMAA-1422 - isolada de solos de caatinga). Uma unidade formadora de colônia bacteriana (UFC) desta cepa foi inoculada em um meio de cultura estéril para crescimento de Caldo Triptona de Soja (TSB, do inglês *Trypticase Soy Broth*) líquido (sem ágar) com a utilização de uma alça de inoculação. Para a promoção do crescimento, os frascos foram acondicionados em uma incubadora à 35°C com agitação constante até o meio apresentar turbidez.

Após o crescimento, com o auxílio de uma alça de inoculação, 1 µL do meio foi inoculado em meio sólido em placa por meio da técnica de esgotamento para a confirmação da presença das bactérias no meio e verificação se houve contaminação de alguma natureza. Para tanto, as placas foram acondicionadas em uma estufa para crescimento de bactérias a 35°C e após um período de 4 dias, as UFC foram analisadas de forma a promover a caracterização morfológica das colônias bacterianas. Para realização do estudo quantitativo das colônias a serem utilizadas para fabricação das microesferas, a técnica de semeadura em placa *pour-plate* (esfregaço) foi utilizada. O meio de cultura líquido com a indicação de crescimento bacteriano foi agitado e, em seguida, 0,1 mL deste meio foram transferidos para 9,9 mL de líquido de diluição (1:100). Após esta diluição, o meio foi levemente agitado e o plaqueamento foi realizado. Para este plaqueamento, 1 mL da diluição foi transferido para placas de Petri estéreis (3 replicatas). Em seguida, colocou-se 15 mL de ágar com meio nutritivo TBS em casa replicata. As placas foram agitadas suavemente com movimentos rotatórios para promover a mistura da cultura com o ágar. Após a solidificação, as placas foram invertidas e mantidas em uma incubadora à 35°C. Após 4 dias, as UFCs foram contadas com o auxílio de um contador automático de colônias.

2.1.2 *Biochar* como um substrato para a BPCPs: Inoculação

Foram testados dois estados de meio de cultura: com *biochar* diretamente inserido no meio TSB líquido, o qual foi elaborado com os compostos extraíveis em água dos *biochars* e o meio sólido enriquecido com *biochar*. Para o primeiro meio, a obtenção do líquido com os compostos extraíveis em água foi resultado de um processo em batelada onde os *biochars* em baixa dose (0,4%) foram inseridos em 500 mL de água desionizada e mantidos em agitação por 14 dias a 30 °C em um agitador. Depois desse período, o meio de cultura para a semeadura das bactérias foi realizada com a técnica placa *pour-plate* em meio sólido TSB sem *biochar*. Já para o meio de cultura sólido, as amostras de *biochar* foram inseridas em TSB mais ágar e assim, posteriormente, as bactérias foram semeadas nesse meio sólido. Utilizou-se a 0,4% de *biochar* equivalente à baixa dosagem (40 t ha⁻¹), onde as amostras foram designadas como BCA3L, BCA6L, BPM3L, BPM6L (onde BCA3L corresponde ao *biochar* produzido a partir da biomassa BMCA produzido à 300 °C e assim respectivamente) e 2% de *biochar* equivalente à alta dose (200 t ha⁻¹), onde as amostras foram classificadas como BCA3H, BCA6H, BPM3H, BPM6H). As doses de tratamento de *biochar* foram selecionadas com base nas taxas mínimas e máximas de aplicação de campo recomendada (8-50 t ha⁻¹) relatadas na literatura (Major, 2010), baseado na premissa de que existam 1600-1700 toneladas de solo por hectare (Brennan *et al.*, 2014).

2.1.4 Microscopia de Força Atômica com mapeamento químico por infravermelho

Tendo em vista que as cepas utilizadas neste trabalho não sobreviveram à inoculação com os *biochars*, optou-se por verificar se o material pirolisado era de fato um agente causador de estresse sistêmico nos microorganismos. Para tanto, um estudo topográfico de microscopia de força atômica foi conduzido. As imagens foram feitas em meio líquido (tampão fosfato) em modo *tapping* onde ponteiros de silício (NCHR-W), com frequência de ressonância de 320 kHz e constante elástica de 42 N m⁻¹ foram utilizadas.

Para preparar o meio líquido com adição de *biochar*, os inóculos de BPCPs obtidos da suspensão bacteriana (Item 2.1.1) foram lavados duas vezes com solução estéril 0,85% de NaCl usando etapas de centrifugação de 30 min em 3500 rpm. As UFCs lavadas foram avolumadas para o volume de cultura inicial, sendo metade do volume solução estéril 0,85% de NaCl. Após

esta etapa, o inóculo lavado foi deixado agitando a 25 °C por 4h sem *biochar*, como controle, e para os inóculos líquidos com *biochar*, após o período de 4h. As bactérias da cepa *B. aryabhatai* foram inoculadas, com o auxílio de uma alça de inoculação, em meios líquidos de cultivos com e sem *biochar* (controle). O *biochar* foi adicionado nos meios na concentração de 0,4% m V⁻¹. Os frascos foram mantidos em uma incubadora de crescimento à 35 °C, com agitação de 150 rpm. Após 24 h, os controles foram diluídos com solução estéril 0,85% de NaCl na razão 1:10 V V⁻¹. Em seguida, as amostras obtidas foram centrifugadas (centrífuga eppendorf 5430/ 5430 R) a 3500 rpm por 30 minutos à 4 °C. A obtenção dos exopolissacarídeos (EPS) não passou por processo de purificação. Após esta etapa, as amostras foram depositadas em substratos de mica fresca para análises topográficas por Microscopia de Força Atômica. Para as análises de NANO-IR (nano espectroscopia de infravermelho) as amostras foram depositadas em uma placa de ouro e mantidas em um dessecador por 4 horas. As imagens foram feitas em um ambiente de umidade controlada a 5% em temperatura ambiente. Após o imageamento, as amostras foram conduzidas a um NANO-IR para análise química das amostras. Para tanto, pontas de contato NIR2 (PR-EX-nIR2-10), com frequência de ressonância 13,0±0,4 kHz e constante elástica de 0,07 N m⁻¹ foram utilizadas.

2.2 Microbiologia – Fungos

2.2.1 Experimentos de crescimento

Os fungos *Trametes versicolor* (L.:Fr.) Pilát (CBS 114372), *Pleurotus ostratus* (Jacq.) Kummer (CBS 145.22) e *Bjerkandera adusta* (Willd.:Fr.) Karst. (CBS 106622) foram comprados no Centraal Bureau voor Schimmelcultures (CBS-KNAW), Utrecht, Holanda. As culturas de fungos foram cultivadas em Ágar Dextrose de Batata (PDA, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) em placas de Petri no escuro a 20 °C ± 1 °C.

2.2.2. Ensaios sobre o crescimento micelial

Neste estudo, o impacto de várias amostras de *biochar* nas três espécies de fungos foi estudado em dois conjuntos consecutivos de experimentos quanto ao efeito sobre o crescimento. Em resumo, as suspensões aquosas de pó de Ágar Dextrose de Batata (Oxoid) foram preparadas de acordo com as instruções do fabricante e suplementadas ou não (controle) com os *biochars* diferentes em concentrações de 0,4% (BCA3L, BCA6L, BPM3L, BPM6L) e 2% (BCA3H, BCA6H, BPM3H, BPM6H). As doses de tratamento de *biochar* foram selecionadas com base nas taxas mínimas e máximas de aplicação de campo recomendada ($8\text{-}50\text{ t ha}^{-1}$) relatadas na literatura (Major 2010). As suspensões foram então autoclavadas a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min. Alíquotas de 20 mL foram retiradas sob agitação contínua de cada meio, vertidas em placas de Petri de 9 cm de diâmetro e deixadas esfriando até atingir a temperatura ambiente sob condições estéreis. Depois disso, foram coletados inóculos de fungos de 2 mm de raio como um disco micelial excisado da margem crescente das colônias jovens cultivadas em PDA e colocado no centro das placas de Petri preparadas com meio de crescimento sólido com *biochar* e sem *biochar* (controle). Nos ensaios de crescimento, cada tratamento foi replicado cinco vezes. As culturas de fungos foram cultivadas no escuro a $20^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ em 64h para *B. adusta*, 96h para *P. ostreatus* e 144h para *T. versicolor*. A duração dos experimentos foi definida pelo crescimento do micélio do centro (ponto de inóculo) até a borda da colônia em todas as direções.

2.2.3. Análises Estatísticas

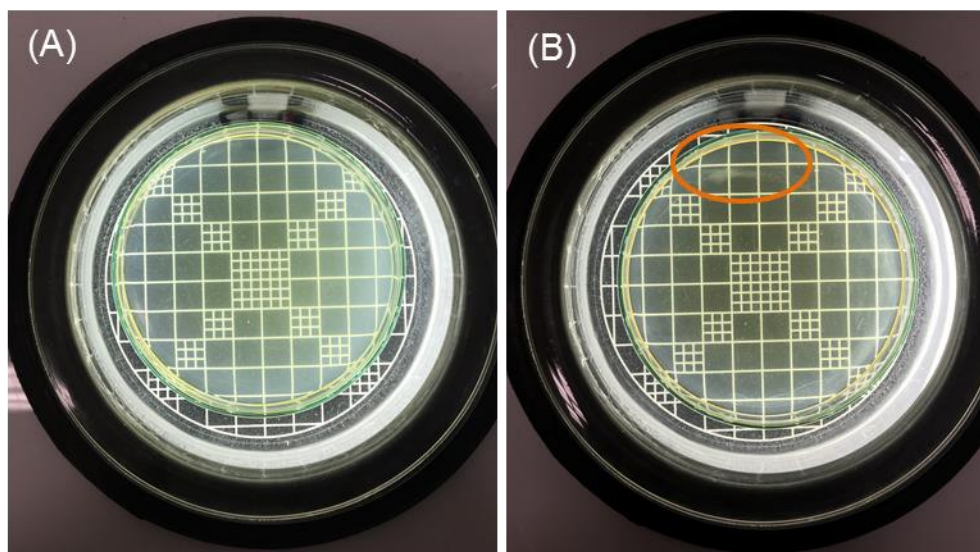
Todos os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância unidirecional (ANOVA) e os meios de tratamentos separados pelo Teste de Fisher - *LSD* (diferença mínima significativa) com valores de P de 0,05, 0,01 e 0,001 usando o Software Estatístico CoStat (Versão 6400, CoHort Software Monterey, CA, EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Bactérias

Foram testados dois estados de meio de cultura: com *biochar* diretamente inserido no meio TSB líquido, o qual foi elaborado com os compostos extraíveis em água dos *biochars* e o meio sólido enriquecido com *biochar*. Para o primeiro meio, a obtenção do líquido com os compostos extraíveis em água foi resultado de um processo em batelada onde os *biochars* em baixa dose (0,4%) foram inseridos em 500 mL de água desionizada e mantidos em agitação por 14 dias a 30 °C em um shaker. A semeadura das bactérias foi realizada com a técnica placa *pour-plate* em meio sólido TSB sem *biochar*. O outro tipo de meio de cultura foi inserindo as amostras de *biochar* em TSB mais ágar e assim, semeadas as bactérias em meio sólido.

Figura 30 – Crescimento não verificado das cepas de bactérias em meio de culturas líquido contendo *biochar*. Efeitos deletérios observados: (A) *Leocobacter sp.* e (B) *Bacillus aryabhatai*. Para as placas semeadas foram constatada algumas manchas leitosas, como indicado pelo círculo.



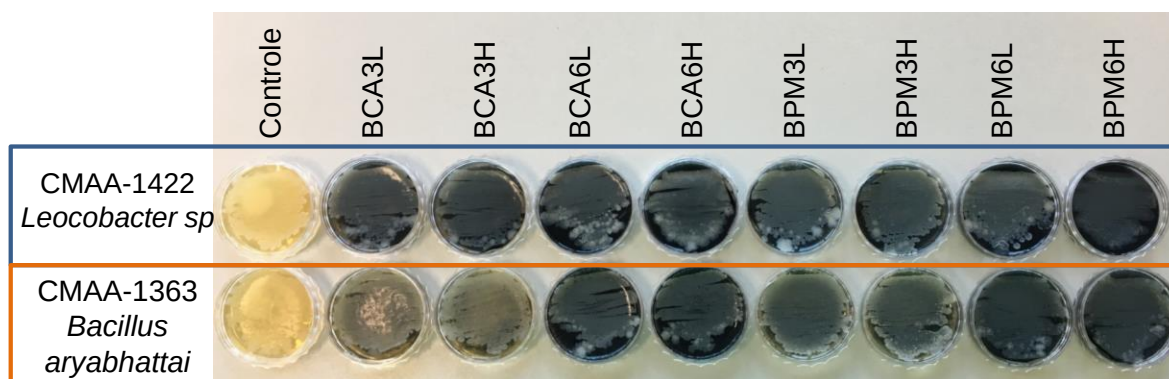
Fonte: Autoria própria

Como pode ser visto nas placas de Petri, na primeira contagem (24h) (Figura 30) as placas contendo a semeadura das bactérias *Leocobacter sp.* e *Bacillus aryabhatai* não apresentaram

crescimento, indicando um efeito deletério na sobrevivência das colônias. Na semeadura de *B. aryabhatai* notou-se a formação de material leitoso. Este material pode ter se formado como uma resposta ao estresse causado às cepas pela presença de *biochar* e será melhor discutido adiante.

Por outro lado, as cepas cultivadas em meio sólido apresentaram alguns focos com colônias de bactérias, onde houve também a formação e liberação de exopolissacarídeos, como mostra a Figura 31. Esse experimento sugere que o meio sólido permitiu melhor adaptação inicial das bactérias testadas, não ocorrendo um efeito deletério completo, como observado em meio líquido. Ainda assim, o *biochar* presente no meio deve liberar alguns compostos que agem como sinalizadores químicos pelo qual as bactérias traduzem como indutoras de estresse e, posteriormente, como resposta, com a liberação deste material.

Figura 31 – Crescimento das cepas de bactérias em meio de culturas contendo *biochar*.

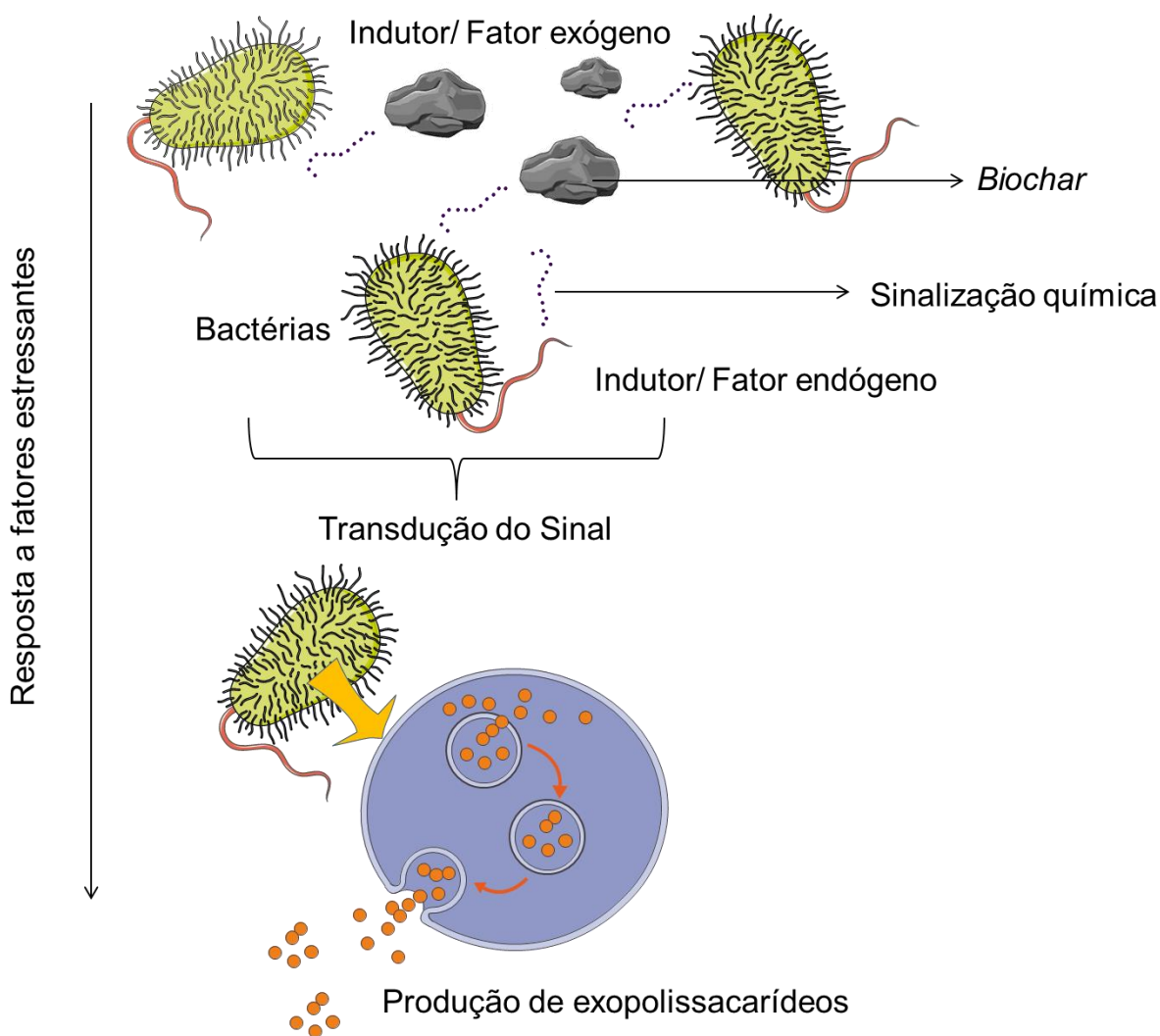


Fonte: Autoria própria

De modo geral, as respostas das linhagens de bactérias utilizadas foram diferentes quando a natureza do meio foi modificada de líquido para sólido, ou ainda, quando a incubação com o *biochar* passou de direta (meio líquido) à indireta (meio sólido). Este fato sugere que a adaptação e sobrevivência das espécies de bactéria dependem da via de interação delas com a estrutura molecular da superfície do *biochar* em questão. Isto é, a força de ligação ou até mesmo de colonização do *biochar* é influenciada pelo tipo de molécula dominante disponível imediatamente na superfície do *biochar*, onde componentes hidrofóbicos, ligações covalentes, forças de van der Waals, troca aniônica ou catiônica ou até mesmo substituição de íon podem agir como

senalizadores químicos que induzem a respostas específicas nas bactérias, como ilustra a Figura 32.

Figura 32 – Interação entre fatores exógenos (presença de *biochar*) e fatores endógenos ao microorganismo para a produção exopolissacarídeos (EPS).

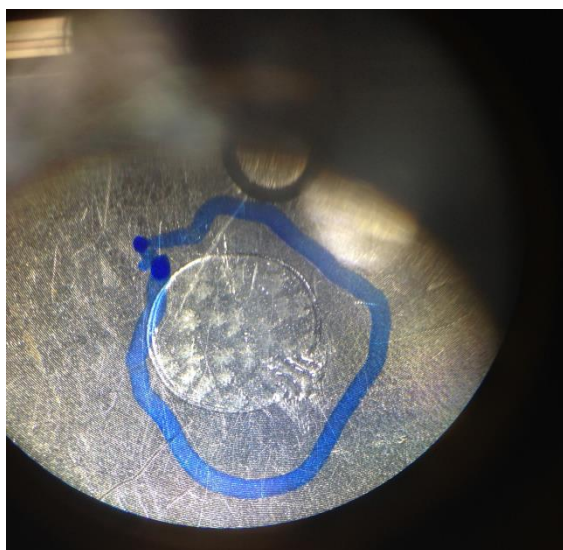


Fonte: Autoria própria

A produção de EPS por bactérias do gênero *Bacillus* sp. já foi relatada na literatura, principalmente frente à condições ou alterações estressantes no ambiente (Kumar *et al.*, 2004;

Chowdhury *et al.*, 2011; Kavamura, 2012). A produção de exopolissacarídeos é um mecanismo de resposta, que pode contribuir, por exemplo, contra mudanças de pH, períodos de seca e dessecação da raiz (Seminara *et al.*, 2012). O biofilme formado por meio da interação com *biochar* se mostrou altamente higroscópico, formando uma estrutura de gel, como mostra a Figura 33.

Figura 33 – Filme de exopolissacarídeos resultantes da interação *biochar*- *B. aryabhattai*



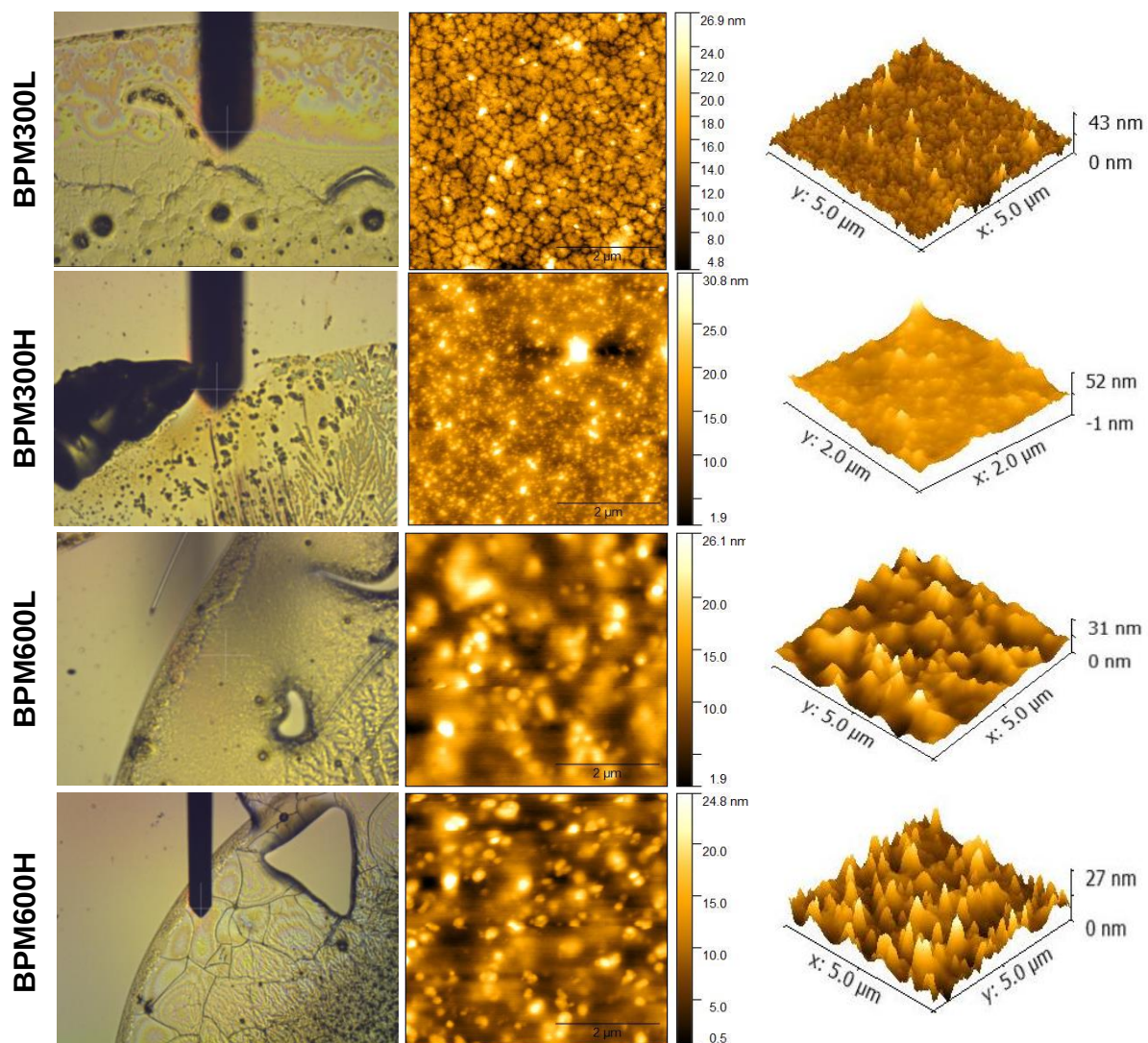
Fonte: Acervo pessoal

3.1.1 AFM com mapeamento químico por infravermelho

Nas Figuras 34 e 35 se observa a formação e liberação de diferentes tipos de biofilmes, de acordo com o tipo e dose de *biochar* inoculado. A resposta topográfica dos filmes liberados pelas bactérias aos diferentes *biochars* mostrou-se dependente da concentração, principalmente para os casos com *biochars* produzidos a partir de BCA, uma vez que os filmes em menores dosagens de *biochar* apresentaram maior altura e com rugosidade mais complexa. Entretanto, os filmes formados a partir da interação de *Bacillus aryabhattai* com *biochars* de BPM não mostraram diferenças de altura e rugosidade significantes. Isso mostra mudanças dependentes da atividade microbiana em resposta ao tipo de *biochar* e, mais uma vez, ao tipo da biomassa de origem. A hipótese é que essa mudança nos biofilmes formados é decorrente da alteração da composição

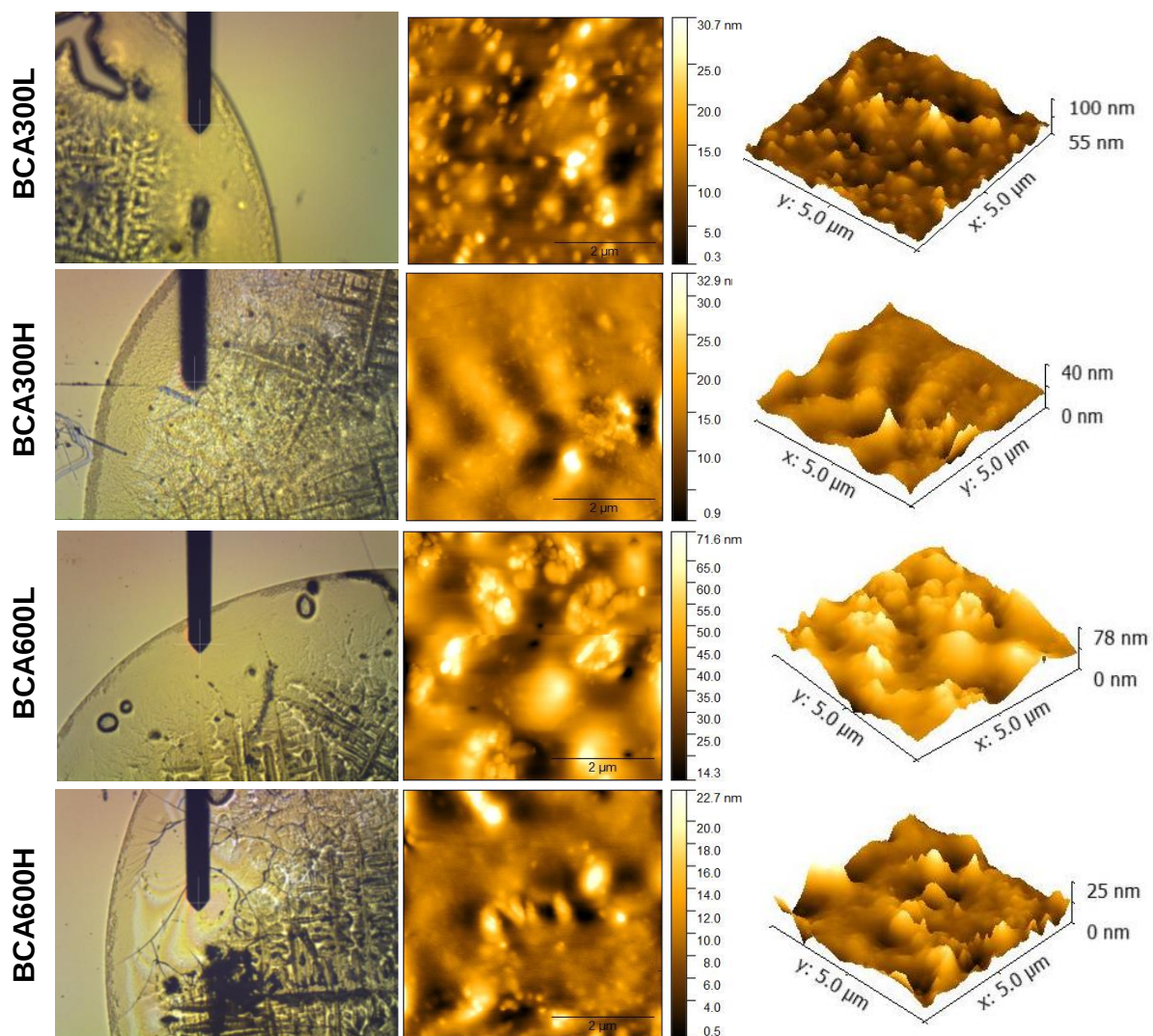
lipídica da membrana celular em resposta a mudanças nas condições ambientais e estressores externos induzidos e presentes na superfície e estruturas dos biochars (produtos residuais de pirólise) (Kieft *et al.*, 1994). Por meio dessa resposta à inoculação com *biochar*, este material pode ser considerado como um agente estressante, pois induz a condições externas ambientais desfavoráveis, desencadeando a formação de biofilmes e alterando no microambiente na qual as cepas estavam inseridas. É interessante destacar que a dosagem influenciou na morfologia e topografia do filme formado.

Figura 34 – Formação de biofilme como resultado da interação de *B. aryabhatai* com *biochar* produzido a partir da palha de sabugo de milho.



Fonte: Autoria própria

Figura 35 – Formação de biofilme como resultado da interação de *B. aryabhattai* com *biochar* produzido a partir do bagaço de cana-de-açúcar.

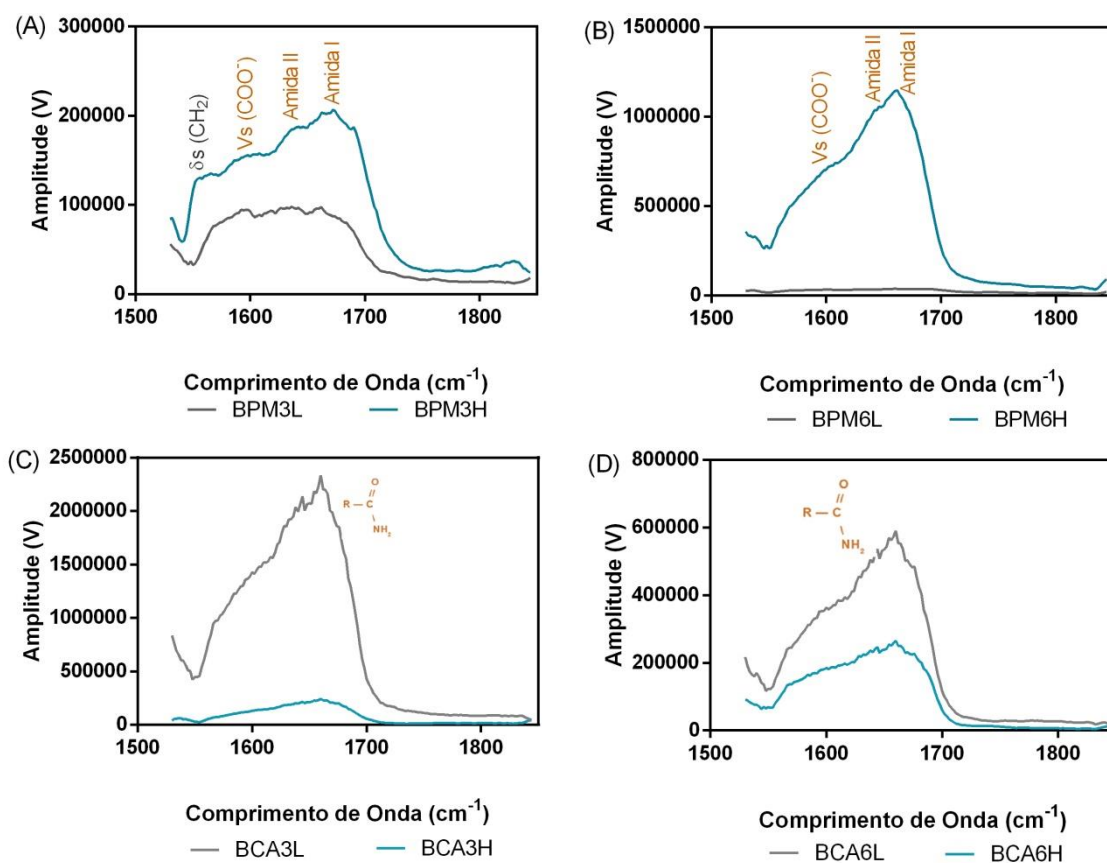


Fonte: Autoria própria

A caracterização dos filmes foi realizada por meio do mapeamento químico por infravermelho na nanoescala (AFM NANOIR). Os espectros (Figura 36) indicaram a presença, principalmente, de grupamentos Amida I e II. Os biofilmes formados a partir da interação com BPM3 baixa e alta dosagem mostraram também indicações de grupamentos de vibração (δ s)

CH₂, que indicam a presença de lipídeos e também de vibrações de estiramento (vs) de grupamentos COO⁻, indicando a presença de proteínas no material formado (Baker *et al.*, 2014).

Figura 36 – Espectros de nano infravermelho obtidos para os biofilmes exsudados de *B. aryabhatai* quando em contato com as amostras de *biochars* testadas.



Fonte: Autoria própria

3.2. Fungos

Os fungos são microorganismos resilientes que possuem grande chance de adaptação quando inseridos em ambientes possivelmente adversos. Por causa dessa característica, o estudo

de toxidade com fungos é bastante interessante, pois por meio deles se torna possível a verificação se o fungo consegue se adaptar a um ambiente adverso ao longo do tempo.

3.2.1 Efeito do *biochar* sobre o crescimento micelial radial

O crescimento micelial das três espécies de fungos testadas foi significativamente afetado ao longo do tempo pela adição de *biochar* no meio de crescimento. Pode assumir-se que as variações de crescimento foram induzidas pela presença de *biochar* (composto exógeno) no meio, uma vez que o PDA é um meio nutricionalmente completo e indicado para o crescimento de fungos.

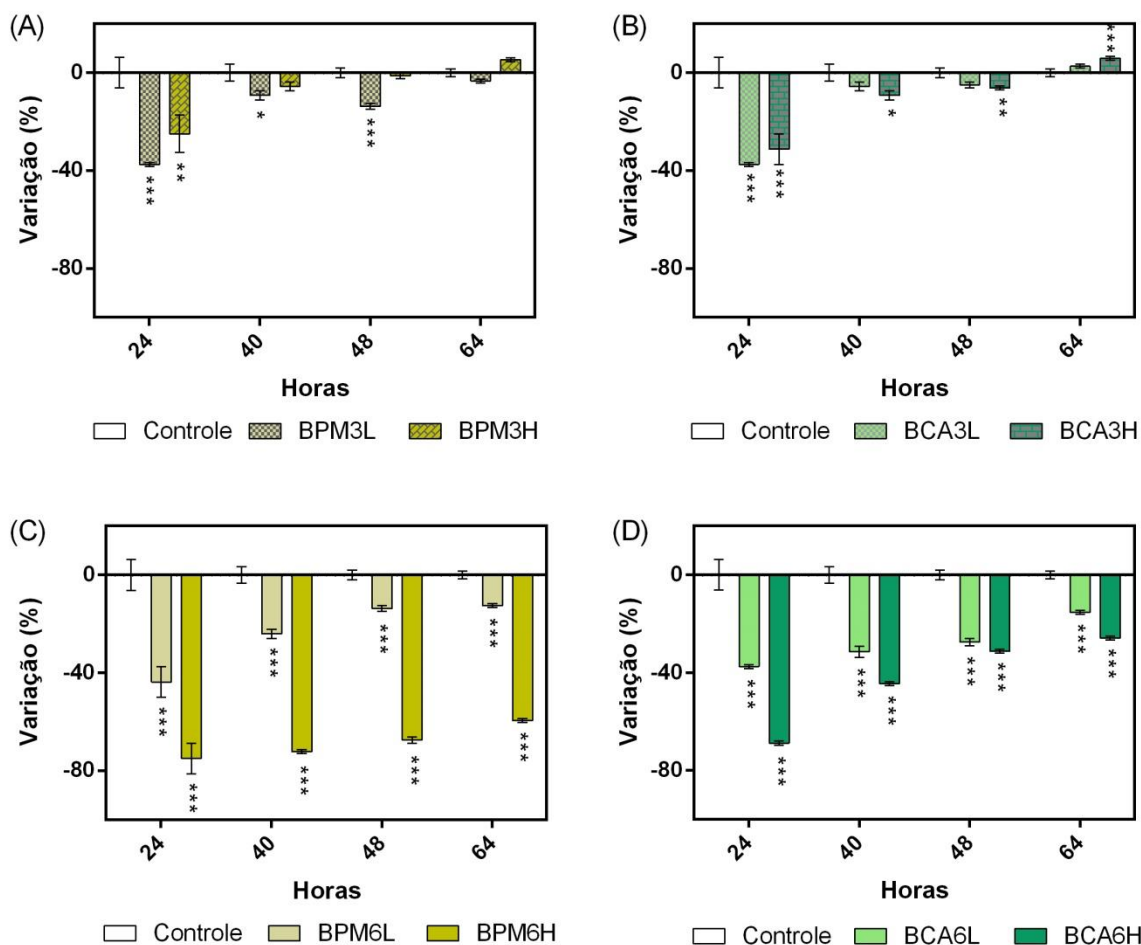
3.2.1.1 *Bjerkandera adusta*

Ambos os tipos *biochar* (BPM e BCA) inibiram significativamente o crescimento de *B. adusta* nas doses testadas. A Figura 37 mostra os efeitos inibitórios expressos como variações na taxa de crescimento (%) medida nos quatro tempos de amostragem em relação ao controle.

Os resultados mostraram que o tipo de biomassa utilizada para a produção de *biochar* (BMPM *versus* BMCA) não afetou significativamente o efeito do *biochar* sobre o crescimento radial dos micélios de *B. adusta*. Por outro lado, o crescimento deste fungo foi influenciado tanto pela temperatura de pirólise quanto pela dosagem de *biochar* inserida no meio de crescimento. Os *biochars* produzidos à 600 °C foram os mais inibitórios para *B. adusta* do que os *biochars* produzidos à 300 °C. Este efeito é compreensível devido à geração de maiores quantidades de compostos potencialmente tóxicos no processo de pirólise conduzido a altas temperaturas do que na pirólise a baixa temperatura. O envolvimento desses compostos potencialmente tóxicos – como, por exemplo, naftaleno, pireno, benz[a]antraceno (Freddo *et al.*, 2012) - é suportado pela correlação dose-resposta que foi observada no crescimento de colônias de *B. adusta* expostas a diferentes concentrações (0,2% ou 0,4%) de BPM600 e BCA600. Por outro lado, observou-se uma correlação inversa em colônias expostas a concentrações baixas dos *biochars* produzidos à 300 °C (L, 0,2%) ou altas (H, 0,4%). Neste último caso, é concebível que o efeito inibitório dos compostos tóxicos gerados no processo de pirólise tenha sido parcialmente atenuado pela

presença de nutrientes residuais nos materiais produzidos a 300 °C, que são, por sua vez, destruídos na temperatura de pirólise à 600 °C. Outra hipótese sustentada é que existe um limiar para temperatura de pirólise na qual as resistências térmicas e biológicas aumentam drasticamente: 360 °C (Mimmo *et al.*, 2014b). Logo, por ser mais resistente ao ataque fúngico, os *biochars* produzidos acima de 360 °C podem resultar em uma toxicidade mais alta (Lyu *et al.*, 2016). A re-condensação de compostos orgânicos voláteis durante o aumento da temperatura de pirólise também pode contribuir para maior disponibilidade de compostos tóxicos presentes na estrutura de *biochars* produzidos em temperaturas elevadas (Oleszczuk *et al.*, 2014). No entanto, para ambos os *biochars* de 300 °C e 600 °C foi observada uma redução do efeito inibitório (% de variação do crescimento radial) ao longo do tempo, o que sugere a ativação de mecanismos bioquímicos de desintoxicação pelo fungo como resposta adaptativa ao meio ambiente.

Figura 37 - Efeito dos *biochars* produzidos a partir de BPM e BMCA sobre o crescimento radial das colônias de *Bjerkandera adusta* em meio de cultura sólido ao longo do tempo, expresso em porcentagem de variação em relação ao controle. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$, de acordo com o teste LSD. O erro padrão da média (n=5) também é indicado.

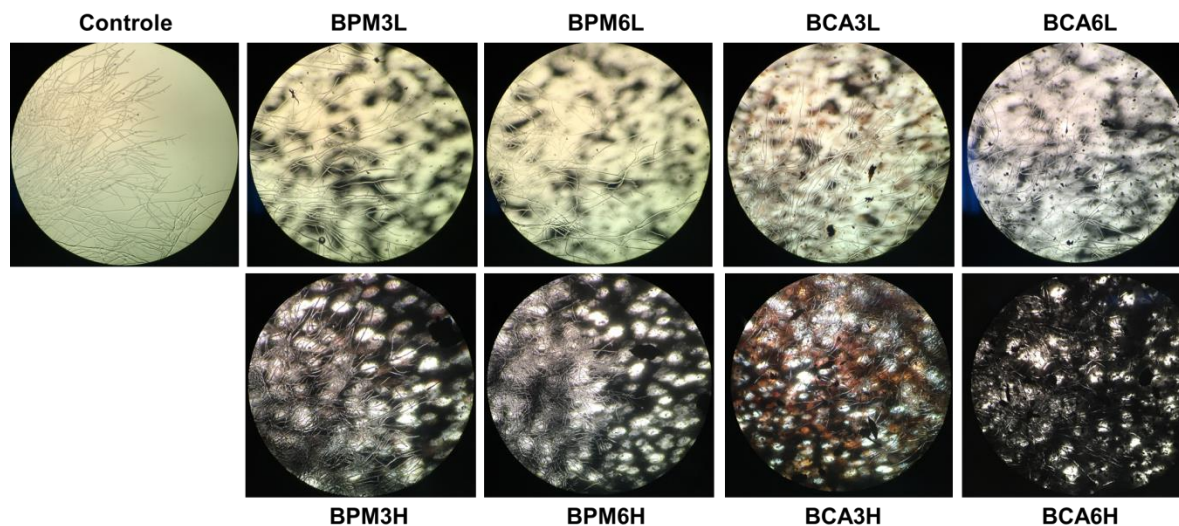


Fonte: Autoria própria

No que diz respeito à análise de imagens de microscópio (Figura 38), o grupo correspondente ao controle (PDA sozinho) mostrou formação de vesículas apicais e uma distribuição regular de morfologia de crescimento. Quando os *biochars* foram adicionados ao meio de crescimento, observaram-se alterações na formação de vesículas apical, densidade e morfologia e em fenômenos de dominância apical das hifas (diferenciação de hifas). Em baixas doses, a diferenciação das hifas tornou-se escassa e houve pouca formação de vesículas. Por outro lado, doses elevadas promoveram um agrupamento do micélio, alterando completamente a

morfologia do crescimento e a geometria, sugerindo que a interação entre o ambiente físico-químico e o genoma dos fungos era prejudicial.

Figura 38 - Efeito das amostras de *biochar* sobre a morfologia dos micélios de *Bjerkandera adusta*.



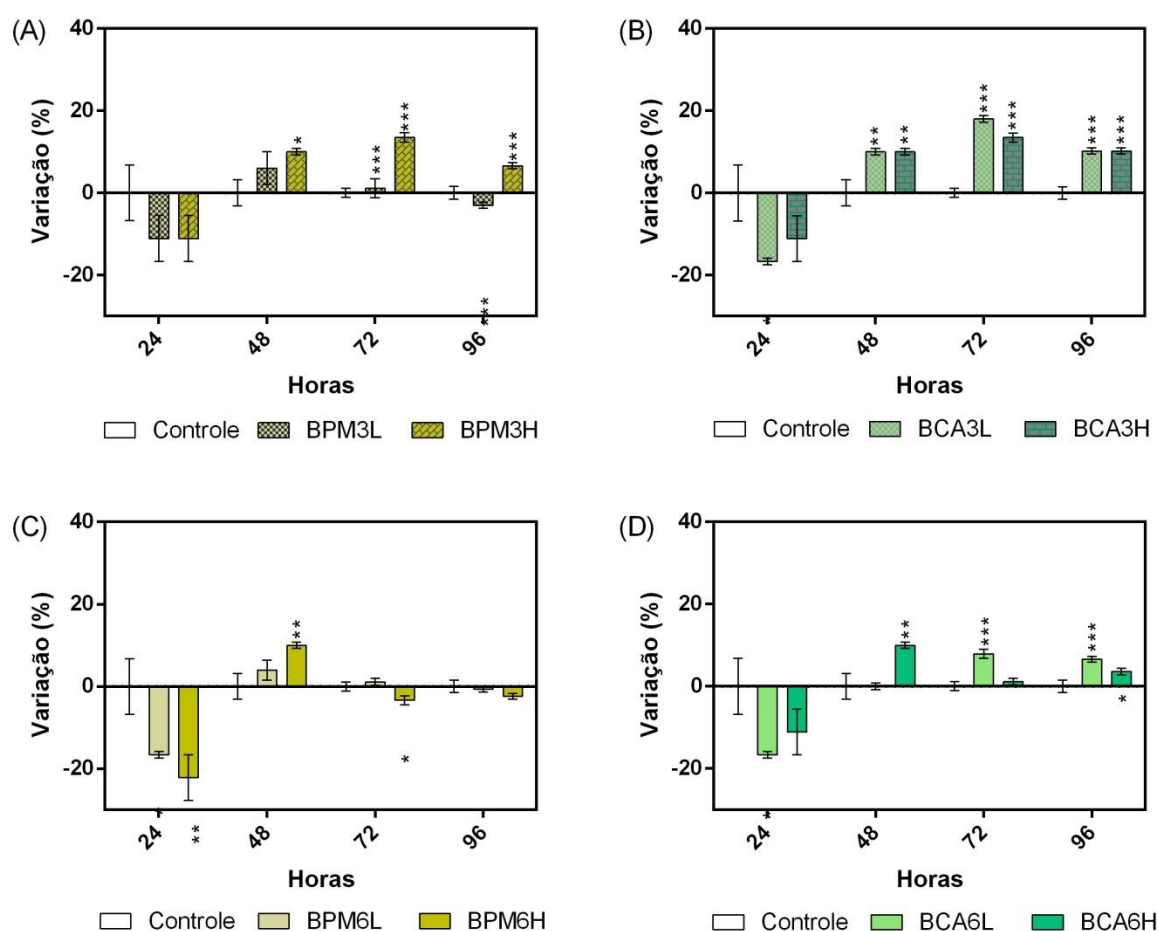
Fonte: Acervo pessoal

3.2.1.2 *Pleurotus ostreatus*

Os efeitos de todas as amostras de *biochar* no crescimento de *P. ostreatus* nas 24h iniciais foram inibitórios (Figura 39). Possivelmente, o fungo *P. ostreatus* precisa de uma repartição inicial adequada dos componentes do substrato para iniciar seu crescimento e, portanto, o crescimento inicial desse fungo nos meios com a presença de *biochar* foi inibido. Isso pode ocorrer devido ao acúmulo de compostos intermediários da decomposição de lignina durante o processo de produção de *biochar*, que foram reportados como produtos finais de decomposição para esta espécie de fungo particular (Covino *et al.*, 2010). A temperatura de pirólise da produção de *biochar* parece influenciar o alongamento das hifas na presença desses produtos tóxicos que são formados pelas vias de degradação, visto que a colônia, em geral, foi estimulada especialmente por *biochars* produzidos à 300 °C (BCA3L e BCA3H com variações de 17,98 e

13,48% respectivamente). Mas é importante ressaltar que amostras de BCA600 também promoveram uma estimulação significativa do crescimento de fungos.

Figura 39 - Efeito dos *biochars* produzidos a partir de BMPM e BMCA sobre o crescimento radial das colônias de *Pleurotus ostreatus* em meio de cultura sólido ao longo do tempo, expresso em porcentagem de variação em relação ao controle. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$, de acordo com o teste LSD. O erro padrão da média (n=5) também é indicado.



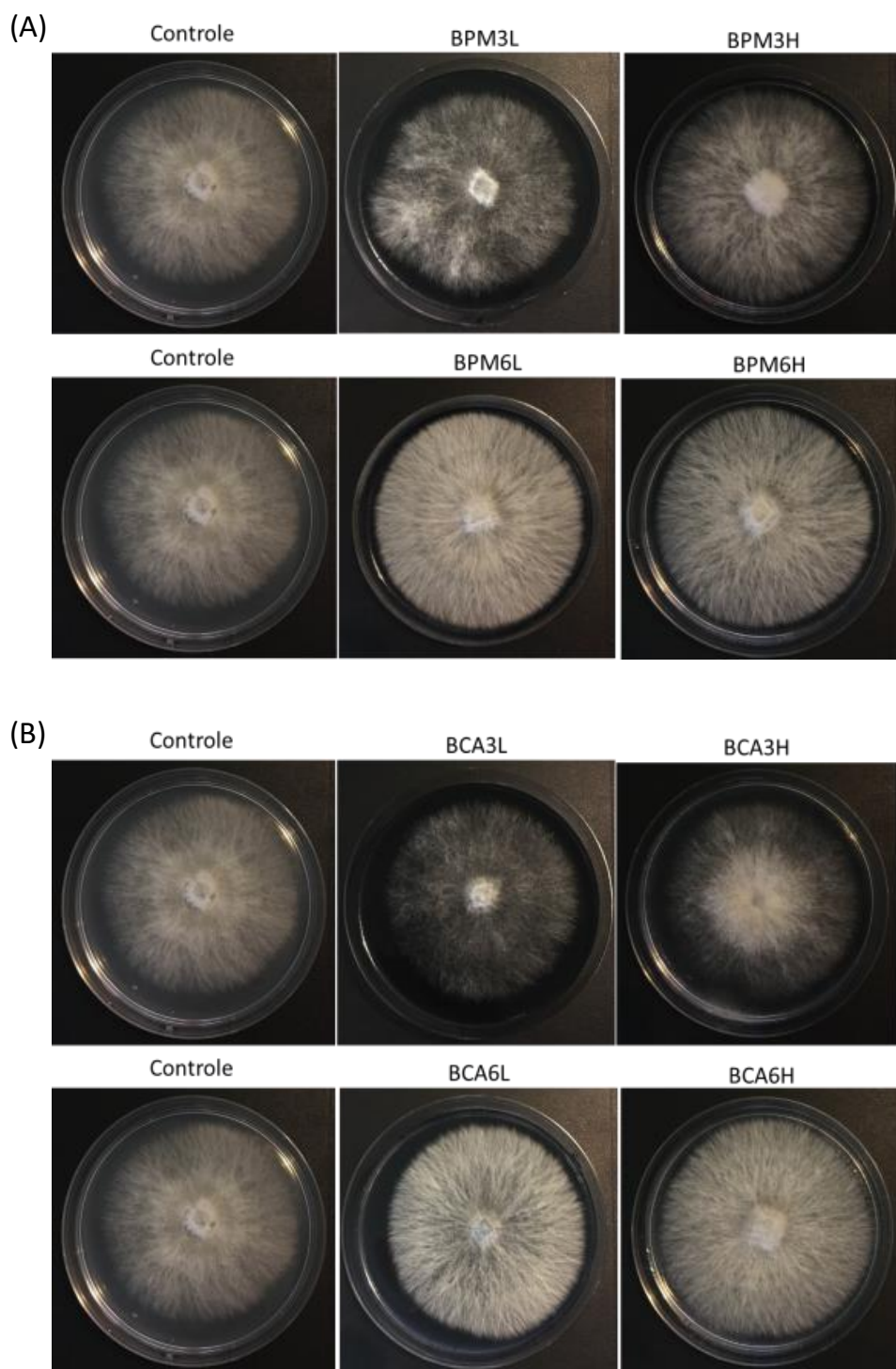
Fonte: Autoria própria

O meio de crescimento sólido permitiu detectar a variação da morfologia das hifas causada pela presença de *biochar* no meio. A análise das imagens das colônias de *P. ostreatus* mostrou as várias modificações na morfologia e densidade das hifas como tentativa de adaptação

ao ambiente (Figura 40). Na grande maioria dos tratamentos, dois tipos de círculos podem ser observados nas imagens: o interior e o externo (não observado apenas no PDA do meio de controle). Os círculos externos mostraram um crescimento muito escasso, com poucas hifas ramificadas, indicando um comportamento exploratório (Ascough *et al.*, 2010). Em contraste, os círculos internos foram caracterizados por anéis densos em placas.

Nesse contexto, a falta de tendência de crescimento observada nos experimentos com *P. ostreatus* levanta a hipótese da aclimação dos fungos aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e outros metabólitos possivelmente tóxicos presentes nos meios de cultura estudados, que constituem uma fonte adicional de carbono (Heitkamp e Cerniglia, 1987). Isso é perceptível para os meios com BPM3H e ambos os experimentos com BCA. Os fungos são organismos flexíveis que podem se aclimatar aos contaminantes presentes no meio e, assim, modificar suas necessidades nutricionais de acordo com a fonte de carbono disponível (Oleszczuk *et al.*, 2014).

Figura 40 - Efeitos dos *biochars* produzido a partir de (A) BMPM e (B) BMCA de sobre a morfologia dos micélios de *Pleurotus ostreatus*.



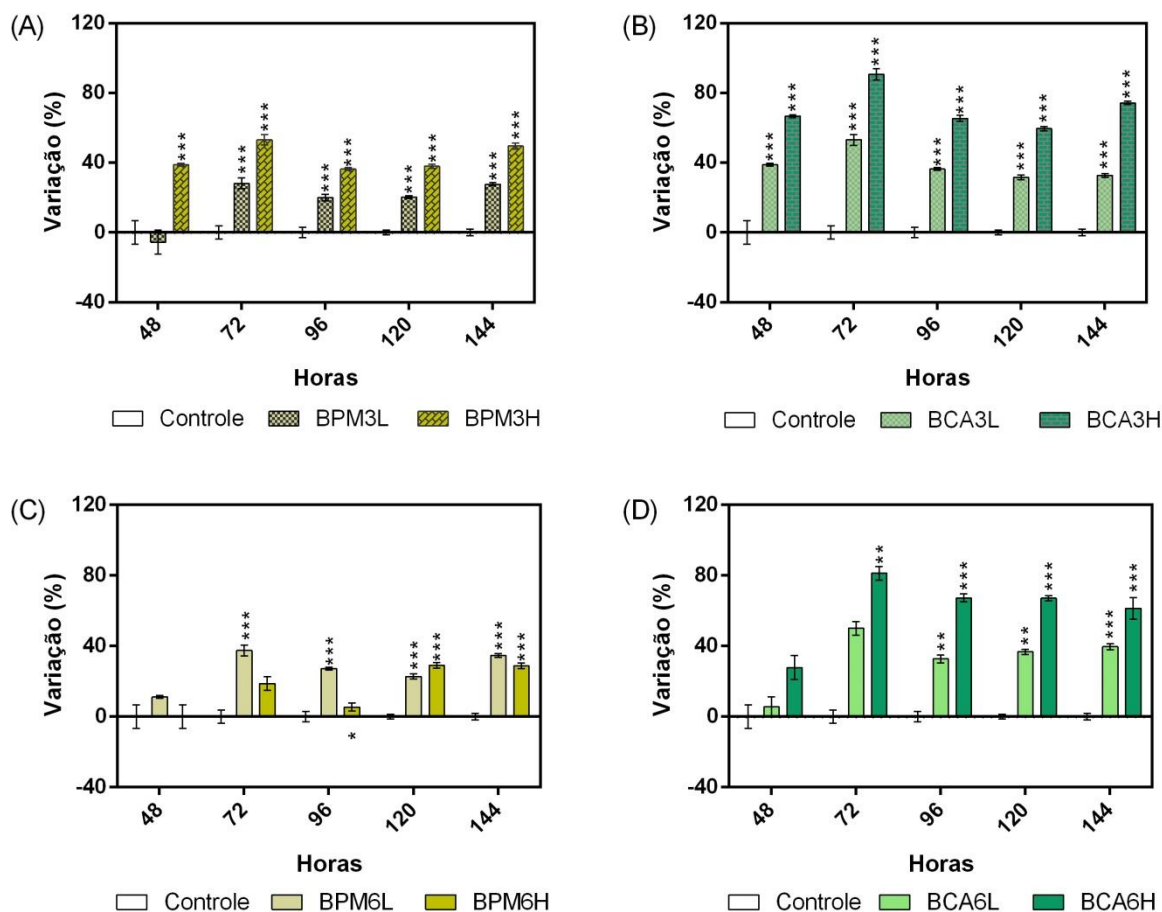
Fonte: Acervo pessoal

3.2.1.3 *Trametes versicolor*

Em contraste com o que geralmente foi observado para *B. adusta* e *T. versicolor*, a adição do *biochar* ao meio de cultura significativamente, e quase proporcionalmente à dosagem utilizada, estimulou o crescimento de *T. versicolor* ao decorrer dos experimentos. Este fungo encontrou condições nutricionais favoráveis, especialmente no meio suplementado com BCA, em ambas as doses testadas. Este resultado é particularmente interessante porque é sabido que o aumento da temperatura de pirólise diminui a heterogeneidade estrutural do *biochar* (Edreis *et al.*, 2014); e justamente esta variabilidade na composição dos *biochars* tem sido relatada como um elemento importante que pode influenciar o crescimento de fungos (Rivas *et al.*, 2004).

Comparando o *biochar* produzido com BMCA com o produzido com BMPM no momento da variação máxima de crescimento (72h), os valores médios de variação em relação ao controle para a pirólise de baixa temperatura BPM3L, BPM3H, BCA3L e BCA3H foram 28, 53, 53 e 91%, respectivamente. Para as amostras de *biochar* obtidas na temperatura de pirólise maior (BPM6L, BPM6H, BCA6L e BC6H), os valores correspondentes foram 38, 19, 50 e 81%, respectivamente. Após 72h, não foi observada uma nova tendência crescente na estimulação do crescimento (Figura 41). Este comportamento pode ser explicado pelo fato de que durante um período de 72 horas, as colônias cultivadas na presença de qualquer amostra de *biochar* atingiram a atividade metabólica máxima, seguidas de uma diminuição devido ao acúmulo de catabólitos ou produtos tóxicos liberados no meio decorrentes da decomposição do *biochar* pelas enzimas fúngicas, além da depleção de nutrientes do meio de cultura.

Figura 41 - Efeito dos *biochars* produzidos a partir de BMPM e BMCA sobre o crescimento radial das colônias de *Trametes versicolor* em meio de cultura sólido ao longo do tempo, expresso em porcentagem de variação em relação ao controle. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$, de acordo com o teste LSD. O erro padrão da média (n=5) também é indicado.

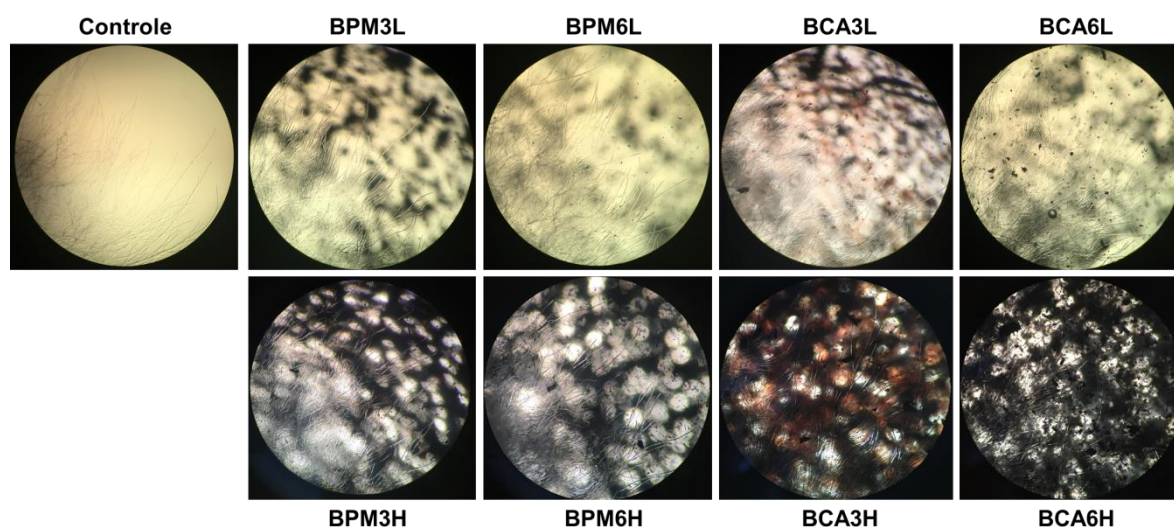


Fonte: Autoria própria

Com relação ao crescimento micelial (Figura 42), as espécies de fungos tentaram manter uma pressão hidrostática positiva dentro das hifas para sustentar uma formação contínua de vesículas apicais e, como resultado, a expansão e o crescimento da região apical (Kües, 2000). Se for possível sustentar a pressão e o turgor celular, os fungos tomam uma estratégia de nutrição que afetará a morfologia do crescimento micelial radial (Nezhad e Geitmann, 2013). No caso do fungo *T. versicolor*, a grande maioria das células foi provavelmente capaz de manter uma pressão hidrostática positiva dentro das hifas e, por isso, o ambiente sinalizou aos fungos para ativar a

atividade enzimática logo que as células eram vigorosas para decompor a lignina no meio de crescimento. Isso é consistente com outros estudos que descobriram que os microorganismos podem assimilar o carbono derivado de *biochar* em sua estrutura, como fonte de nutrição (Santos *et al.*, 2012; Farrell *et al.*, 2013; Mitchell *et al.*, 2015).

Figura 42 - Efeito dos *biochars* sobre a morfologia dos micélios de *Trametes versicolor*.



Fonte: Acervo pessoal

A Tabela 6 apresenta a correlação entre as caracterizações físico-químicas dos *biochars* com o crescimento dos fungos na fase inicial de crescimento (lag), na última leitura (fase log) e em relação à média de crescimento de todas as fases. É importante destacar que houve correlações mais significantes (negativas ou positivas) quando os *biochars* apresentaram comportamento tóxico ao crescimento e adaptação das hifas (*B. adusta*). Na fase lag de *P. ostreatus*, onde a expressão tóxica foi mais significativa, as correlações foram novamente observadas.

Tabela 6 - Análise de correlação entre o crescimento dos fungos na presença de *biochar* as características físico-químicas dos materiais. A fase inicial compreende a segunda contagem do experimento, a qual é considerada como a fase lag, ou seja, fase inicial de crescimento e adaptação do fungo; já a fase final (log) compreende a última contagem do teste. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$, de acordo com o teste LSD. $\emptyset$ = correlação não significativa.

Correlação das Variáveis		Espécie de Fungo								
		<i>B. adusta</i>			<i>P. ostreatus</i>			<i>T. versicolor</i>		
		Fase lag	Fase log	Todas as fases	Fase lag	Fase log	Todas as fases	Fase lag	Fase log	Todas as fases
pH		$\emptyset$		* (-)	* (-)	$\emptyset$	$\emptyset$		$\emptyset$	$\emptyset$
Boehm	Carboxílicos	*	*	*	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	Lactônicos	*	*	*	*	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	Fenólicos	*	*	*	*	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	Básicos	* (-)	** (-)	** (-)	* (-)	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
RMN	Carbonila	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	Alquila	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	*	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	Tot Arom C	$\emptyset$	* (-)	* (-)	* (-)	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	C(non-prot)	$\emptyset$	* (-)	* (-)	** (-)	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	C(prot)	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
BET	C Constante	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	Área Esp. Sup.	* (-)	* (-)	* (-)	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	Superf. Total	* (-)	* (-)	* (-)	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	Superf. Micro.	* (-)	* (-)	* (-)	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	Superf. Exter	* (-)	* (-)	* (-)	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	Microp Vol _G	* (-)	* (-)	* (-)	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	Microp Vol _L	* (-)	* (-)	* (-)	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
EDS	C	* (-)	* (-)	* (-)	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	N	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	*	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	O	*	*	*	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	Mg	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	* (-)	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	Si	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	*	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	Ca	$\emptyset$	* (-)	* (-)	* (-)	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	K	$\emptyset$	* (-)	* (-)	* (-)	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	Mn	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	* (-)	* (-)	* (-)	$\emptyset$	$\emptyset$
	C/N	$\emptyset$	* (-)	* (-)	* (-)	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
COD		$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	*	*	*	$\emptyset$	$\emptyset$
Molhabilidade		$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$

Fonte: Autoria própria

Como os fungos preferem ambientes ácidos a básicos, os grupos ácidos quantificados pelo método de Boehm, mostraram correlação positiva, indicando que possivelmente houve modificação no pH do ambiente de crescimento após a semeadura. As correlações negativas do crescimento com as características físicas do *biochar* (análises BET), sugerindo que a área

superficial disponível e estrutura porosa, em geral, para contato com o meio parece não interferir na manifestação de comportamentos antagônicos. Este fato corrobora com o fato que mesmo os *biochars* apresentarem, geralmente, uma grande área e volume de micro e nanoporos, estes não são acessíveis para microorganismos (ou suas hifas) e, portanto, não refletem sua capacidade funcional como um material carreador de biofertilizantes. A macroporosidade observada em micrografias, por exemplo, compõe apenas uma pequena fração da área superficial total do *biochar* (Hardie et al., 2014).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A biota responde rapidamente às variações ambientais e têm sido apontados como indicadores biológicos importantes das transformações que ocorrem no solo. Dessa forma, após verificar os efeitos dos diferentes tipos de *biochar* produzidos neste trabalho, notou-se que as alterações induzidas pelos *biochars* quando em contato com os microorganismos não estimularam a atividade bacteriana na mesma extensão que a fúngica. Mitchell *et al.* (2015) investigando o efeito de *biochars* feitos de madeira de maple encontraram uma relação oposta: estímulo da atividade bacteriana em detrimento da fúngica, indicando de modo significativo a importância e influência da biomassa de origem nas mudanças dentro de comunidades microbianas do solo. Logo, a interação deste material com microorganismos pedológicos, dependendo da espécie, biomassa de origem, dosagem e temperatura de pirólise pode ser antagônica ou positiva. Aqui, para o caso das bactérias, foram utilizados diferentes estados de meios de cultura com adição de *biochar* para simular o ambiente e, assim, verificar se os recursos abióticos de suporte ao crescimento e desenvolvimento da espécie foram modificados. Isto permitiu observar a versatilidade de bactérias pedológicas frente à fatores estressantes e assim, contribuir para a criação de materiais agronômicos mais seguros que não criem pontos de bifurcação no fluxo de energia e de matéria do sistema pedológico.

Já as respostas dos fungos às amostras de *biochar* mostraram que, embora *biochars* possam apresentar alguma toxicidade, esta depende do tipo de biomassa utilizada para a produção e a espécie de fungos analisada. Para *B. adusta*, a maior dose de *biochar* aplicada exibiu o efeito inibitório máximo após 24h da inoculação e, no caso do *biochar* produzido a partir de BMPM, a inibição persistiu em todo decorrer do experimento, indicando uma forte toxicidade e sugerindo a

necessidade da utilização de uma menor dose de aplicação *biochar*. Por outro lado, existe a possibilidade de que a adição de *biochar* ao solo possa ser um método de supressão de doenças causadas por *B. adusta*, já que esta espécie é classificada como um agente patogênico de plantas que causa a podridão branca em árvores vivas (Nakamura *et al.*, 1999). Este viés já foi relatado na literatura, onde o *biochar* aplicado ao solo suprimiu o patógeno *Fusarium* causador de doença podridão da raiz aspargos (Matsubara *et al.*, 2002). Este fato induziu a experimentos que comprovaram que o *biochar* também pode liberar compostos químicos que desencadeiam respostas sistêmicas no sistema solo-microorganismos-plantas (Harel *et al.*, 2012; Graber e Elad, 2013). Em relação ao fungo *P. oestratus* se observou alterações principalmente na morfologia e densidade dos micélios como uma estratégia de adaptação ao estresse que o *biochar* causou. Os resultados obtidos também evidenciaram a importância da temperatura de pirólise que pareceu influenciar mais do que a própria biomassa de origem. Neste contexto, a resposta ao crescimento de fungos a presença de *biochar* é consequência da toxicidade direta e da adaptação das espécies testadas.

Por outro lado, o fungo *T. versicolor* mostrou ser a espécie mais adaptada, podendo usar as moléculas presentes nos *biochars* e transformá-las em uma fonte de nutrição efetiva. Esse fato também mostra que o *T. versicolor* pode reduzir a toxicidade de compostos fenólicos aprisionados nas estruturas do *biochar*. No mesmo contexto, é importante perceber que *T. versicolor* é estimulado em altas concentrações de *biochar*. Contrariamente a essa tendência, *B. adusta* foi inibida em altas concentrações de *biochars* produzidos à 600 °C, enquanto que *P. oestratus* mostrou ter uma tendência ao equilíbrio e adaptação. Isso significa que *T. versicolor* possui mecanismos de desintoxicação ou necessidades ambientais diferentes do que as outras duas espécies de fungos testadas. No caso para o fungo *T. versicolor*, a hipótese é que, no ambiente do solo, os altos níveis de crescimento de fungos podem inibir o crescimento bacteriano devido à liberação competitiva, causando desequilíbrio no sistema pedológico. Isto ocorre porque os fungos têm requisitos nutricionais mais baixos em relação aos nutrientes e condições ambientais requeridas pelas bactérias (Güsewell e Gessner, 2009), na qual maior teor de carbono livremente disponível favorece o crescimento fúngico (Oleszczuk *et al.*, 2014). Do ponto de vista da fertilidade e da produtividade do solo, um crescimento intensificado de fungos é desfavorável devido às suas propriedades fitopatogênicas e toxinogênicas.

Finalmente, os resultados obtidos neste capítulo indicam que os efeitos dos *biochars* nas comunidades de microorganismos pedológicos podem ser subestimados, pois sua aplicação pode impactar negativamente na adaptação e desenvolvimento de microorganismos residentes no solo, sendo, portanto, um obstáculo significativo que limita a sua aplicação. Portanto, o crescimento fúngico e respostas bacterianas ao meio com *biochar* precisa ser cuidadosamente considerado para a avaliação do risco ambiental da aplicação deste material carbonáceo, a fim de evitar perturbações deletérias no fluxo de energia e matéria do sistema pedológico.

CAPÍTULO III

A INFLUÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DE *BIOCHAR*, ESFERAS POLIMÉRICAS DE *BIOCHAR* E NUTRIENTES NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE SEMENTES DE MILHO

RESUMO

Enquanto a maioria dos estudos com *biochar* apresentados na literatura mostram efeitos positivos na produção de biomassa e crescimento de plantas, efeitos inibitórios também têm sido recentemente evidenciados. Logo, existe a necessidade de definir, analisar e certificar a qualidade agrônômica dos *biochars* frente às suas diferenças físico-químicas dependentes da biomassa de origem e condições de processamento térmico. Neste contexto, o objetivo deste capítulo é avaliar o processo do desenvolvimento inicial das sementes de milho quando modulados por fatores externos à semente por meio da aplicação de biochar de BMPM e BMCA em pó. Também tem por objetivo avaliar a interferência de uma barreira polimérica na modulação do uso biochar frente à aplicação do produto em testes agrícolas (escala laboratorial), bem como avaliar a liberação de micro e macronutrientes de esferas de alginato carregadas com fosfato de rocha. Por fim, também objetiva avaliar a influência na germinação e desenvolvimento das sementes quando a irrigação é realizada com exsudados de *Bacillus aryabhattai* obtidos em resposta à incubação com biochar. Foi constatado que existe uma forte correlação entre o desenvolvimento das plantas, processo inibitório com o conteúdo presente na fração de carbono orgânico dissolvido, onde são encontrados compostos fitotóxicos extraíveis em água. Os compostos apresentaram efeito inibitório significativo principalmente no desenvolvimento do sistema radicular, inibindo a elongação das raízes e, consequentemente, reduzindo a absorção de nutrientes e água pelas plantas. Por fim, pelo fato dos compostos fitotóxicos serem altamente móveis, a barreira imposta pela encapsulação com alginato não foi eficiente para reduzir ou retardar os efeitos inibitórios observados.

Palavras-chave: *biochar*, desenvolvimento de sementes de milho, esferas de alginato, fósforo de rocha, exsudatos

1. INTRODUÇÃO

As interações, correlações e funções desempenhadas pelo solo vão além do que vemos brotar dele. O solo é uma entidade viva que afeta o ecossistema e a biosfera de forma significativa. Por isso, reconhecermos a complexidade do sistema pedológico é o primeiro passo para que possamos interferir de modo sinérgico, não afetando de forma prejudicial o andamento de fluxo dentro dele, criando pontos de bifurcações nos quais o nível de complexidade do dano seja irreversível. Vezzani e Mielniczuk (2001) afirmam que o solo é um sistema que precisa ser interpretado: interpretado em seus diversos níveis, conjuntamente. Identificar pontos vulneráveis no sistema solo-planta-microorganismos quando se insere um material não natural neste ambiente é importante para a qualidade ambiental de um ecossistema. A aplicação de *biochar* em sistemas agrícolas precisa levar em conta não somente o rendimento das culturas, mas sim o fato de que um solo saudável e respeitado em suas relações multitróficas geram plantas mais saudáveis e, assim, os fluxos e insumos nele inseridos podem ser mais bem aproveitados.

Após a constatação das características físico-químicas dos *biochars* produzidos e seu comportamento quando incubado com microorganismos pedológicos, é necessário responder questões propostas conjuntamente quando o condicionante de solo é inserido em sistemas agrícolas. Para tanto, este capítulo irá abordar investigações relacionadas ao efeito do *biochar* na germinação e desenvolvimento inicial de sementes de milho, bem como os efeitos quando o *biochar* é encapsulado em esferas de alginato.

1.1 Estudos de germinação e desenvolvimento de sementes na presença de *biochar*

O *biochar* é um material complexo, pois pode ser produzido a partir de diferentes biomassas de origem, por meio de diferentes métodos e regimes de pirólise. Cada forma de produção leva a um material com características físico-químicas e morfológicas únicas. Mudando somente a biomassa de origem, por exemplo, se modifica totalmente tanto características físico-químicas como teor de inorgânicos, teor de carbono e outros compostos orgânicos, visto que as características morfológicas são definidas pela distribuição de lignina, celulose, hemicelulose. No Capítulo I deste trabalho isso foi verificado ao mudar o tipo de biomassa de origem. Atualmente, muitos pesquisadores e agricultores usam diferentes terminologias e formas de classificar o

biochar que produzem (Joseph, Peacock, *et al.*, 2010). Estes fatos demonstram como a via para a construção de um sistema de classificação e padronização do *biochar* como um material agrícola pode ser longa. Joseph *et al.* (2010) propuseram um sistema de classificação para o *biochar* baseado nos efeitos desejados do material quando inserido em sistemas agrícolas.

Neste contexto, conhecer como a presença de *biochar* afeta o ambiente na qual é inserido, principalmente no que diz respeito à germinação e desenvolvimento de sementes de importância econômica, pode contribuir para melhores vias de conhecimento do material carbonáceo em questão e, assim, promover seu uso com segurança e qualidade agrônômica.

1.2 Encapsulação: Alginato de Sódio

O alginato (ALG) é um biopolímero aniônico composto de cadeias lineares de ácido α -L-glucurônico e β -D-mannurônico. É um polímero constituído por uma ou mais redes poliméricas estruturadas tridimensionalmente e formadas por cadeias macromoleculares interligadas por ligações covalentes (reticulações). Essas cadeias na presença de íons tais como Ca^{++} formam hidrogéis, filmes, esferas, micro e nanopartículas (De Paula *et al.*, 2010). O alginato apresenta propriedades significantes como resistência mecânica, alta permeabilidade, uniformidade do gel, atóxico, biodegradabilidade e pode ser considerado como um material de origem renovável, visto que a principal matéria-prima para a produção do alginato é composta de substâncias da parede celular de algas pardas (Bressel, 2007; Aouada e Mattoso, 2009). Além dessas propriedades, o ALG apresenta capacidade para encapsulamento de uma série de substâncias tais como fármacos, princípios ativos agrícolas e microrganismos (Tønnesen e Karlsen, 2002; Krishna Rao *et al.*, 2006; Young *et al.*, 2006; Rekha *et al.*, 2007; Domingues *et al.*, 2014; Grillo *et al.*, 2016).

Por ser um polímero biodegradável, o ALG é uma opção de veículo carreador ecologicamente seguro, uma vez que pode ser um material degradado pela ação de microrganismos sem causar danos ao ambiente em que é inserido (Silva, M. F. *et al.*, 2009). O alginato é o material mais comumente utilizado para a encapsulação de diversos ativos e microrganismos (Fenice *et al.*, 2000), pois liberam os materiais encapsulados conforme ocorre a sua degradação polimérica no ambiente.

A utilização de esferas de ALG para a liberação de insumos agrícolas tem sido amplamente investigada para diminuir a quantidade de princípios ativos aplicados no campo, bem como para aumentar a eficiência de atuação destes insumos (Da Silva *et al.*, 2012; Campos *et al.*, 2014; Berninger *et al.*, 2016). Neste contexto, podem-se destacar alguns benefícios de sistemas carreadores na agricultura (Aouada e Mattoso, 2009):

- Diminuição de custos relacionados ao volume de princípio ativo e consequente redução de riscos de contaminação, poluição ambiental e contaminação humana;
- Aumento da eficiência funcional do princípio ativo (proteção contra degradação físico-química e manutenção da concentração ótima do insumo no meio em que é aplicado);
- Aumento da segurança de manuseio e transporte desses materiais.

1.2.1 Encapsulamento via aprisionamento em gel

Como mencionado anteriormente, o ALG por ser constituído de cadeias lineares de ácido α -L-glucurônico (blocos G) e β -D-mannurônico (blocos M) e, portanto, por conter grupos carboxilas, é altamente dependente do pH do meio que é inserido, já que ele pode dissociar ou incorporar prótons, como o cálcio, por exemplo (Cendon, 2014). Assim, uma maneira de aprisionar e encapsular princípios ativos em esferas de alginato é gotejar a substância a ser encapsulada (juntamente com o alginato) em soluções de cloreto de cálcio para, dessa forma, formar hidrogéis por meio da reação dos íons de cálcio com o alginato. Essa reação ocorre instantaneamente quando o íon se associa à carboxila dos blocos G formando uma estrutura conhecida como “*egg box*” e é chamada de reticulação a frio.

Uma vez que a reticulação ocorre, a esfera formada adquire similaridade com a difusão de medicamentos para o olho humano, onde há difusão do medicamento em ambos os sentidos. Quando se transfere esse modelo para uma esfera de alginato, dependendo do pH do meio externo, o fluxo de massa/ fluidos determina se haverá intumescimento ou dissolução do polímero (processo difusivo), determinando assim a velocidade de liberação ou “vazamento” do princípio ativo.

1.3 Princípio Nutritivo: Fosfato de Rocha

Sabe-se que o fósforo existe nas formas orgânicas e inorgânicas na natureza, sendo um dos nutrientes menos solúveis no ambiente (menos de 5% do fosfato total do solo é disponível para as plantas (Dobbelaere *et al.*, 2003)). Das grandes quantidades de fertilizantes fosfatados aplicados no solo, uma grande porcentagem é prontamente imobilizada pelo alumínio, ferro (solos ácidos) e pelo cálcio (solos básicos) deixando o fosfato indisponível para a utilização pelas plantas. A solubilização pode ocorrer por meio da liberação de íons ortofosfatos solúveis e/ ou pela mineralização de compostos orgânicos fosfatados por meio da liberação de enzimas fosfatases (Garcia *et al.*, 1993) com a ação de microorganismos do solo. Estas atividades de solubilização têm sido reportadas como o principal mecanismo de promoção de biomassa vegetal.

A utilização de fosfatos naturais é bastante viável para culturas perenes (longo prazo), pois o índice de eficiência agrônômica começa a ser notável a partir do segundo ano de aplicação, sendo um fertilizante de efeito posterior (Souza, 1997). Devido a este fato a utilização de fosfatos de rocha (FR) juntamente com outros fertilizantes ou condicionantes de solo é uma prática interessante, visto que é uma atividade que promove a saúde e qualidade pedológica e não somente o rendimento imediato da cultura. Neste contexto, a utilização de fosfato de rocha com *biochar* deve ser investigada com a finalidade de encontrar pontos de bifurcação no sistema não termodinâmico do solo; visto que o *biochar* tem a tendência de aumentar o pH do solo e o FR possui maior eficiência como fertilizante em solos ácidos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Produção das esferas de alginato

A solução de alginato foi preparada com o auxílio de um homogeneizador tipo TURRAX (MA102) e mantida em agitação até completa dissolução do material (aproximadamente 20 minutos). Após a homogeneização, a solução foi mantida em repouso refrigerado por 12 horas para a remoção das bolhas de ar. Após esse período a solução obtida pode ser utilizada para mistura com *biochar*, fosfato de rocha ou outro princípio ativo, onde, nesses casos, a mistura foi

mantida em agitação por 10 minutos (TURRAX) e, em seguida, mantida em repouso para estabilização da dispersão.

As esferas de alginato foram produzidas a partir do método de reticulação rápida, onde a formação das esferas ocorre pelo gotejamento da solução de alginato 3% (m m^{-1}) em uma solução de cloreto de cálcio (0,1M) em agitação. Neste método, quando a gota de alginato entra em contato com a solução de íons de cálcio é formada uma zona de reticulação na superfície da esfera que evolui em direção ao centro da esfera (Teixeira, 2011). Por este motivo, as esferas foram mantidas em contato solução de CaCl_2 , sob refrigeração, durante 12h para homogeneizar a zona de reticulação de cada esfera, permitindo a difusão dos íons de cálcio na estrutura do alginato. Diferentes concentrações de alginato foram testadas (1,5%, 2%, 3% e 4%), bem como a altura do bico gotejador (15 e 30 cm). Antes do uso das esferas em experimentos diversos, elas foram lavadas com água destilada em abundância.

2.1.1 Influência do meio iônico de reticulação na liberação de fósforo em esferas

A influência da composição de meio iônico de reticulação das esferas de ALG carregadas com Mono-Amônio-Fosfato (MAP) e fosfato monopotássico (KH_2PO_4) foi investigada por meio da adição de fósforo MAP e KH_2PO_4 (50 mg L^{-1}) na solução de CaCl_2 (0,1M). Após a produção das esferas, as amostras foram submetidas a um ensaio de liberação em meio aquoso (água destilada) onde alíquotas nos intervalos de 0, 1, 5, 15, 30, 60, 120, 240, 480, 1440, 2880, 4230 e 7200 minutos foram recolhidas. A quantificação de fósforo foi feita por espectrofotometria de emissão atômica por plasma de argônio acoplado indutivamente (ICP OES) da Agilent Technologies (modelo 700 Series). As características experimentais são indicadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Características e condições operacionais utilizados no ICP OES para determinação de fósforo total.

PARÂMETROS	VALORES
Potência de radiofrequência (W)	1100
Vazão de gás no plasma (L min ⁻¹)	15,0
Vazão de gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,5
Vazão do gás nebulizador (L min ⁻¹)	0,6
Tipo de nebulizador	Concêntrico (tipo Sea Spray)
Câmara de pulverização	Tipo ciclone
Linhas de Emissão (nm)	P (213.618)

Fonte: Autoria própria

Adicionalmente, o gel de alginato 3% mais fosfato de rocha e as esferas produzidas com esta mesma solução (iguais em massa (g)) foram submetidos à digestão assistida por micro-ondas para verificar a quantidade de fósforo total presente em cada microesfera. As extrações assistidas por micro-ondas foram realizadas em um digestor MARS-XP1500 Plus (Microwave Accelerated Reaction System for Extraction and Digestion, CEM, Mathews, NC, USA). Amostras de massa 0,5 g foram inseridas nos reatores do equipamento em duplicata com 8 mL de HNO₃ e 2 mL de HCL, ambos os reagentes concentrados e destilados. Os parâmetros operacionais do digestor aplicado ao tratamento das amostras foram: temperatura de 200 °C por 15 minutos, energia do magnetron 100%, tempo para alcançar configurações 15 min, sem velocidade de agitação e pressão mantida a 800 psi.

2.1.1.1 Cálculos dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O LD e LQ foi calculado usando a recomendação da União Internacional da Química Pura e Aplicada (IUPAC) como mostra as Equações 7 e 8.

$$LD = \frac{3 \times SD \text{ branco}}{a} \quad (7)$$

$$LQ = \frac{10 \times SD \text{ branco}}{a} \quad (8)$$

onde *SD branco* é o desvio padrão de dez medidas das intensidades de emissão das soluções branco (solução com NHO_3 5%), no comprimento de onda escolhido e *a* é a inclinação da reta da curva de calibração. A curva de calibração apresentou coeficiente de correlação R^2 de 0,9265.

2.1.1.2 Cálculo da liberação cumulativa de fósforo em solução

Os resultados de liberação sustentada de fósforo foram quantificados em termos de liberação cumulativa (LC) em função do tempo e em função da concentração de fósforo inicial, como mostra a Equação 9 (Lupo *et al.*, 2015).

$$LC (\%) = \frac{QL_t}{QC_\infty} \times 100 \quad (9)$$

onde QL_t é a quantidade de fósforo total liberada pela microesfera no tempo *t* e QC_∞ é quantidade total de fósforo carregada nas esferas.

2.1.2 Estabilidade das esferas

A estabilidade do tamanho das esferas ao longo do tempo e em diferentes valores pH (meio aquoso) foi investigada por meio da liberação da carga de corante Amarelo Crepúsculo encapsulados em ALG. O acompanhamento da liberação foi realizado por meio de leitura das absorbâncias do meio no qual as esferas estavam inseridas em um espectrofotômetro UV-Vis em 481 nm. A curva de calibração foi montada com soluções de concentração do corante de 0 até 2 mg L^{-1} , sendo que foram inicialmente produzidas com uma solução de 2 mg L^{-1} . A faixa de pH dos meios dos ensaios variaram de 2 a 9 e foram realizados em duplicata. O diâmetro de dez esferas carregadas com Amarelo Crepúsculo foram medidas com o auxílio de um paquímetro e, em seguida, inseridas nas soluções com pH modificado. Alíquotas foram retiradas nos intervalos de 0, 5, 24, 72 e 240 h. Depois de encerrado o teste, cada grupo de esferas teve seu diâmetro foi medido novamente.

2.2 Teste de Germinação

A certificação da qualidade agronômica do *biochar* é importante para sua aplicação no solo com segurança, bem como sua aceitação nas culturas agrícolas. A qualidade agronômica é um aspecto relevante, pois como o *biochar* pode ter características diversas decorridas do seu modo de processamento térmico, pouco se sabe sobre os possíveis efeitos adversos em culturas diversas. Casos de fitotoxicidade decorrente do uso de *biochar* já foram relatados (Rogovksa *et al.*, 2012).

Em relação à produção agrícola, é essencial que condicionantes ou fertilizantes destinados ao uso pedológico não sejam fatores de estresse abiótico, *i.e.*, que não afetem parâmetros como taxa de germinação, desenvolvimento de sementes, produção de biomassa e rendimento das culturas (Bargmann *et al.*, 2013). Neste sentido, testes de germinação foram conduzidos para avaliar os possíveis efeitos benéficos ou fitotóxicos dos *biochars* produzidos neste trabalho e, assim, agir como indicadores da qualidade agronômica desses produtos carbonáceos. Foram utilizadas sementes de milho do cultivar AL-AVARÉ (CATI – Lote IB-IB-016/16). A espécie milho foi escolhida, pois é uma cultura potencial economicamente para o Brasil e também por apresentar ciclo de crescimento rápido e alta produção de biomassa (Brennan *et al.*, 2014). Segundo recomendam as Regras para Análise de Sementes (1992), as avaliações foram realizadas diariamente à mesma hora, a partir do dia em que surgiram as primeiras plântulas normais sendo dispostas de forma aleatória em uma incubadora de germinação com fotoperíodo de 16 h a 30 °C. Estas plântulas foram computadas, retiradas do substrato e classificadas ao término do experimento. É importante citar que foi feito um escalonamento dos controles, de modo que não houve um intervalo de tempo expressivo entre a primeira e a última amostra avaliada. Os testes fisiológicos foram feitos em laboratório e, portanto, caracterizados como método indireto de análise (Krzyzanowski *et al.*, 1999).

2.2.1 Análise e escolha do substrato

Para os testes de germinação foi escolhido um substrato de composto orgânico adubado para garantir que não haja deficiência de micro e macro nutrientes nas plantas e, assim, investigar somente a influência dos *biochars* no desenvolvimento inicial das sementes de milho. A análise

química e física do substrato são instrumentos básicos para a transferência de informação sobre o estado nutricional do ambiente, bem como seu estado mecânico. Delas depende a utilização racional e econômica dos insumos do solo na Agricultura (Chitolina *et al.*, 2009). Adicionalmente, a avaliação da fertilidade do substrato é o primeiro passo para a definição das medidas necessárias para a correção e o manejo da fertilidade de um solo (Silva, F. C. *et al.*, 2009), visto que a nutrição mineral das culturas é o mais importante fator de aumento da fertilidade.

O substrato utilizado nos experimentos foi analisado conforme a última versão do *Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater*, EPA e ABNT, quando aplicável. A análise de sólidos totais foi realizada de acordo com o POP PA 058 Rev. 02. A determinação do nitrogênio total foi de acordo com o POP PA 113 / Embrapa-Manual de Análises de Solos. As análises de pH seguiram a metodologia descrita no POP PA 056 / USEPA 9045D. A análise de metais foi realizada por Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP OES), onde a determinação seguiu a metodologia descrita em SMWW 3120B e o preparo das amostras foram realizados de acordo com a metodologia que conta na EPA 3010A:1992. Enfim, a análise de capacidade de troca de cátions (CTC) do substrato foi realizada de acordo com a metodologia descrita em Química para Avaliação da Fertilidade de Solos Tropicais do Instituto Agronômico. As medições foram baseadas na incerteza padrão combinada, gerando assim, um nível de confiança de 95% ($k=2$). Os resultados são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados para a amostragem composta do substrato utilizado para os testes de germinação.

PARÂMETROS	UNIDADE	RESULTADOS ANALÍTICOS
Porcentagem de Sólidos	% p p ⁻¹	79,0
pH (suspensão a 5%)	--	7,5
pH em solução salina (CaCl ₂)	--	6,7
Nitrogênio Total Kjeldahl	% p p ⁻¹	1,45
Potássio	% p p ⁻¹	0,24
Fósforo	% p p ⁻¹	0,50
Cálcio	% p p ⁻¹	1,46
Magnésio	% p p ⁻¹	0,15
Ferro	% p p ⁻¹	1,17
Manganês	ppm	200
Enxofre	% p p ⁻¹	0,40
Sódio	ppm	695
Cobre	ppm	90
Zinco	ppm	190
Boro	ppm	255
Carbono Orgânico	% p p ⁻¹	8,0
Matéria Orgânica	% p p ⁻¹	22,65
Cinzas	% p p ⁻¹	77,35
C/N	--	5/1
CTC	mmol kg ⁻¹	290
CTC/C orgânico	--	36,3

Fonte: Autoria própria

2.2.2 Preparo do substrato e enchimento dos recipientes de semeadura

Para o preenchimento dos ambientes de germinação, o substrato escolhido passou por um preparo inicial de modo a torna-lo o mais homogêneo possível, diminuindo assim possíveis variações nos resultados finais. A amostra de substrato foi amontoada em uma superfície plana previamente limpa e coberta com lona de plástico de modo a sofrer perda de umidade suficiente para atingir o teor ideal para seu manuseio. Após esta etapa, o substrato foi armazenado permitindo, assim, a germinação de plantas daninhas e sua remoção antes do preenchimento dos vasos. O teor de umidade atingido foi de 1/4 (~23% cm³ cm⁻³) da capacidade de campo. Após essa etapa, o substrato foi homogeneizado com uma peneira de malha de 6 mm de abertura de arame galvanizado. Esta abertura foi escolhida para não induzir a compactação do substrato,

facilitando a irrigação e o desenvolvimento radicular. Uma parte do substrato homogeneizado foi destinada à análise de teor de umidade. Para o enchimento dos copos, inicialmente uma folha de papel mata-borrão foi colocada sobre o furo existente no fundo do copo, de modo a impedir que o substrato se perdesse. Em seguida, os vasos foram identificados em função dos tratamentos que receberam. Os copos foram preenchidos com o substrato homogeneizado até 5 cm da borda superior. Durante o processo, pequenas pancadas foram exercidas no copo de modo a promover um acamamento da terra no interior do vaso. O substrato foi então removido do copo e pesado para determinação de qual massa deveria ser inserida em cada vaso. A massa do substrato contida nos copos foi corrigida para a massa seca, para fins do cálculo do volume de água a se adicionar nos tratamentos. O teor de umidade no enchimento dos vasos foi mantido em torno de 25 a 30% da capacidade de campo.

2.2.3 Modo de aplicação do fertilizante e semeadura das sementes de milho

Após a pesagem das dosagens de *biochar* e das esferas, uma camada de 3 cm de substrato foi removido de cada copo e feitos sulcos a 2 cm para a semeadura e aplicação em sulcos dos materiais a serem testados. Após o processo, o substrato foi devolvido ao vaso. A irrigação dos copos foi verificada diariamente e ajustada para 2/3 da capacidade de campo, para que o volume de água perdido por evapotranspiração não prejudique o experimento. A irrigação foi feita por meio de spray para não haver impacto da água sobre o substrato.

2.2.4 Ensaio de desenvolvimento das sementes de milho

Para avaliar os efeitos das dosagens e modos de aplicação de *biochar* no desenvolvimento de sementes de milho, diferentes tratamentos foram realizados. São eles:

1. *Biochars* BPM e BCA em pó produzidos a 300, 400 e 600 °C, aplicados no sulco;
2. Microesfera contendo *biochars* BCA
3. Microesfera contendo *biochars* BCA e BPM + fósforo rochoso
4. Sementes inoculadas com exsudados de *Bacillus* obtidos da interação com *biochars* BPM e BCA produzidos a 300 e 600 °C

5. Testemunha (substrato)

As plantas germinadas das sementes de milho foram plantadas de acordo com o indicado pela EMBRAPA (Neto e Coelho, 2010) com 10 repetições por tratamento ($n=10$), sendo cada planta considerada como uma parcela experimental. O experimento teve duração de 7 dias, onde a planta se encontra dentro do estágio vegetativo V2 de desenvolvimento, verificado em testes de controle prévios. A área e o perímetro foliar foram medidos com o auxílio de um medidor de área foliar Area Meter AM350 da ADC BioScientific Ltd. Para a aferição da área e perímetro as folhas foram retiradas da plântula na altura da bainha da folha (~ 1 cm acima da superfície do substrato). O sistema radicular foi retirado com o mesocótilo para aferição da massa fresca e seca das raízes. A primeira, segunda e terceira folhas (quando presentes) foram medidas separadamente.

2.2.4.1 Crescimento da plântula – Classificação e produção da matéria seca

O vigor relativo dos blocos experimentais foi também avaliado por intermédio da avaliação da massa média de produção de biomassa foliar e radicular. Esta metodologia está baseada no princípio que as amostras que apresentarem maiores massas médias de matéria seca são consideradas como sendo mais vigorosas, pois se consegue determinar a transferência de matéria seca dos tecidos de reserva para o eixo embrionário (Krzyzanowski *et al.*, 1999). Ou seja, aqueles em que os tratamentos propiciaram ou contribuíram para maior qualidade ambiental (fator externo) para a germinação e desenvolvimento das sementes.

A determinação do peso da massa seca das plântulas foi feita, inicialmente, com o auxílio de uma tesoura cirúrgica para a remoção dos cotilédones (eixo embrionário da planta) ou o restante das sementes. Dessa forma, somente as plântulas e sistema radicular foram obtidos e pesados separadamente. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em sacos de papel, separadas por replicata, e colocadas em uma estufa de circulação mecânica de ar a $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 96 horas (Cruz *et al.*, 2004). Após este período, as amostras foram retiradas e colocadas em um dessecador para atingir a temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Uma vez esfriadas, as amostras foram pesadas em uma balança de precisão e a o peso de matéria seca (PMS) (mg plântula^{-1}) foi determinado, segundo a Equação 10.

$$PMS = m_f - m_s \quad (10)$$

onde, m_f é a massa fresca cada plântula separada por área foliar e sistema radicular e m_s é a massa seca dos materiais.

2.2.5 Análises estatísticas

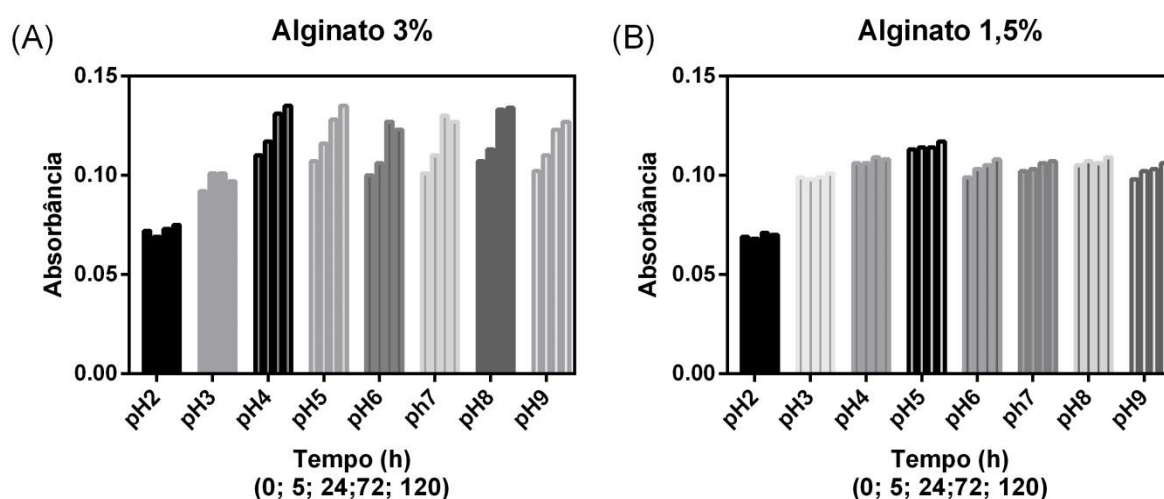
Todos os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância unidirecional (ANOVA) e os meios de tratamentos separados pelo Teste de Fisher - LSD (diferença mínima significativa) com valores de P de 0,05; 0,01 e 0,001 usando o Software Estatístico CoStat (Versão 6400, CoHort Software Monterey, CA, EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Produção de esferas de alginato

Escolher a concentração adequada de alginato para alcançar as vantagens desse meio de encapsulação, é necessário verificar comportamentos como liberação do princípio ativo e capacidade de solubilidade em um meio. Como os solos brasileiros, em sua maioria, são ácidos, procurou-se estabelecer critérios experimentais em ambientes com valores de pH igual à 4. Na Figura 39 é possível observar a influência do pH do meio na estabilidade das esferas por meio da liberação do corante Amarelo Crepúsculo no meio aquoso.

Figura 39 – Influência do pH do meio na estabilidade das esferas. (A) e (B) Liberação do princípio ativo (amarelo crepúsculo) ao longo do tempo em diferentes valores de pH.

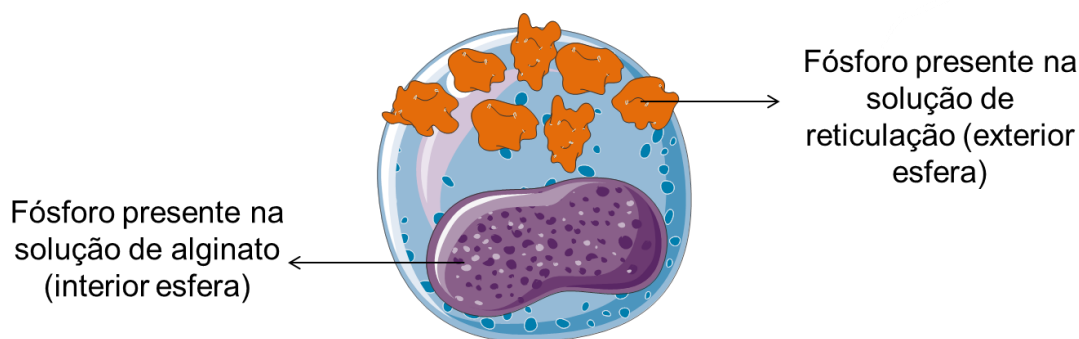


Fonte: Autoria própria

Para as esferas produzidas com ALG 3% é possível verificar que a liberação do corante ocorre ao longo do tempo para todos os valores de pH. Verificou-se que em ambas as concentrações de ALG o meio de pH 2 reduziu o diâmetro das amostras por até metade do tamanho inicial. Já a liberação do ativo testado ao longo do tempo se mostrou mais sustentada

também na solução reticulante (CaCl_2), este pode também influenciar na composição da microesfera, dando origem a materiais mistos, como sugere a Figura 41. Este tipo de material misto pode ser útil para promover a liberação do ativo externo (presente nas estruturas da zona de troca de massa e fluidos) mais rapidamente do que aquele imobilizado nas estruturas internas no gel.

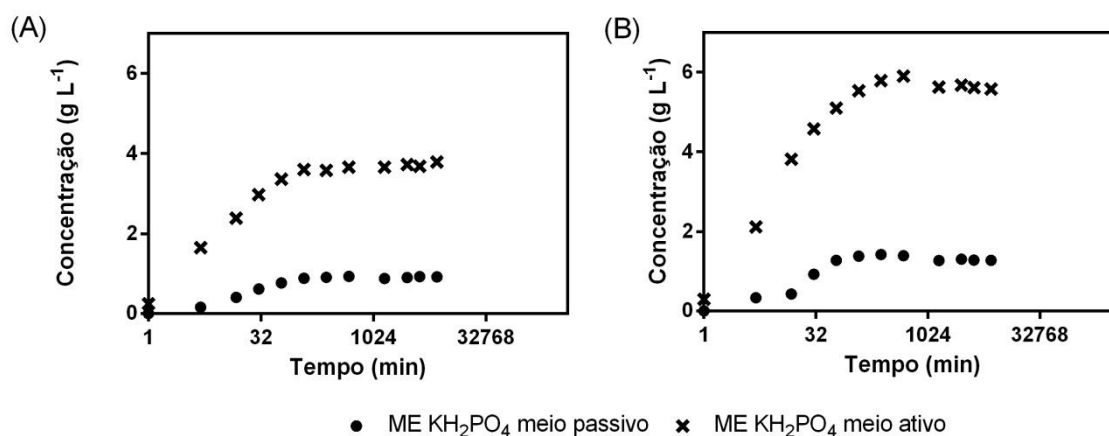
Figura 41 - Influência do meio iônico de reticulação de esferas de ALG: meios mistos/ ativos.



Fonte: Autoria própria

Dessa forma, como mostra a Figura 42, notou-se que a adição de ativos na solução hipercatiônica aumentou a quantidade de fósforo total liberado no meio aquoso ao longo do tempo. Isto tem uma implicação prática interessante, já que alguns casos requerem que o ativo seja liberado prontamente no ambiente em maior quantidade, seguida de posterior liberação sustentada.

Figura 42 - Influência do meio iônico de reticulação na liberação de fósforo em esferas carregadas com (A) KH_2PO_4 e (B) MAP. Meio passivo: Somente com Ca^{++} ; Meio ativo: Ca^{++} mais princípio ativo. Escala logarítmica.

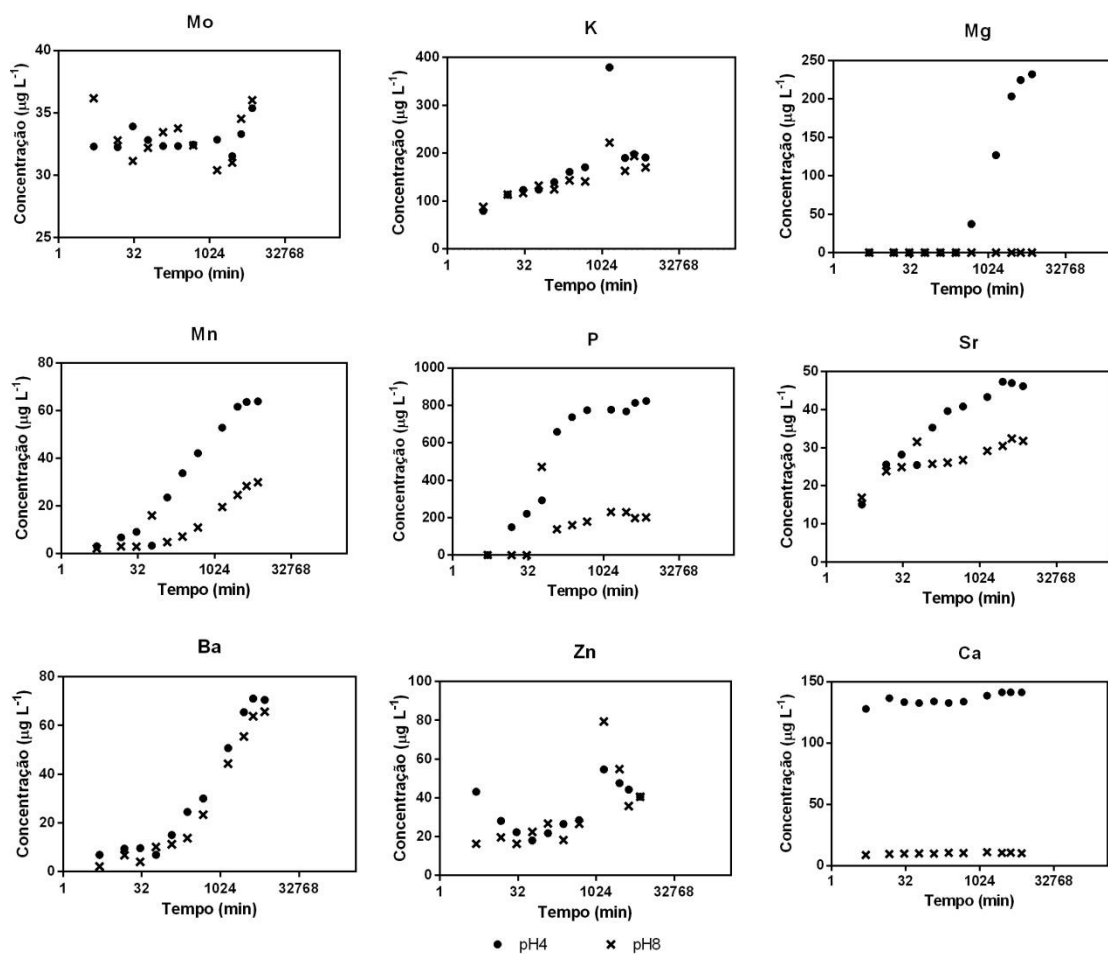


Fonte: Autoria própria

3.2 Liberação de nutrientes presentes no fósforo de rocha

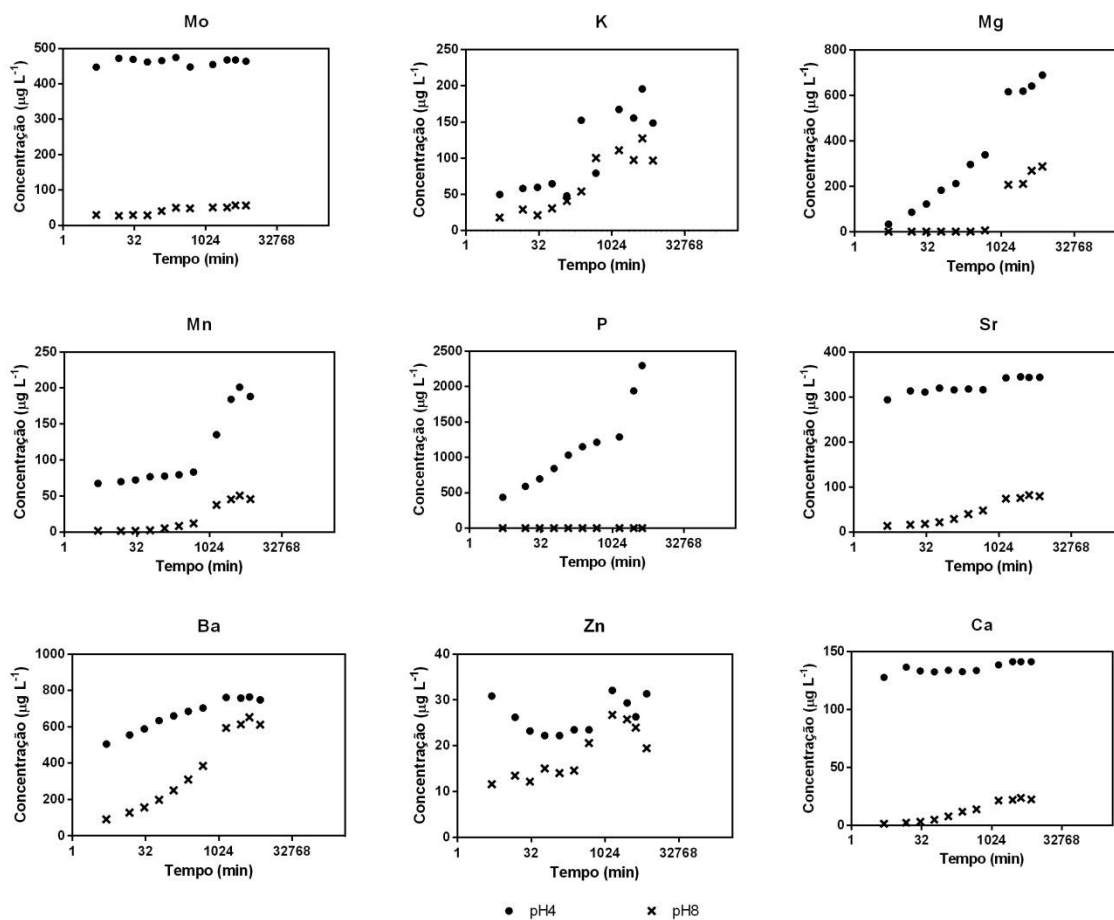
Para verificar o conteúdo dos macro e microelementos presentes no fosfato de rocha e a influência de sua encapsulação, foram realizados experimentos de batelada em diferentes meios aquosos em pH ácido e básico. A influência da encapsulação por ALG na liberação dos nutrientes no meio foi avaliada comparando com as mesmas condições experimentais, porém sem a encapsulação do FR, como mostram as Figuras 43 e 44, respectivamente.

Figura 43 – Perfis de liberação em meio aquoso ácido (pH4) e básico (pH8) dos macro e micronutrientes presentes em esferas 3% ALG de fósforo de rocha. Escala logarítmica.



Fonte: Autoria própria

Figura 44 – Perfis de liberação em meio aquoso ácido (pH4) e básico (pH8) dos macro e micronutrientes presentes no fósforo de rocha. Escala logarítmica.



Fonte: Autoria própria

Nos dois meios testados houve extração dos micro e macronutrientes, porém a encapsulação permitiu que os elementos não fossem prontamente distribuídos no meio aquoso. Por volta de 30 h de interação, obtiveram-se diferentes concentrações disponíveis em solução, como mostra a Tabela 8.

Tabela 8 – Diferença de quantificação de elementos presentes no FR: influência da encapsulação na alíquota de 15 minutos em meio aquoso pH4.

Veículo em meio ácido	Elementos ($\mu\text{g L}^{-1}$)								
	Mo	Ba	K	Mg	Mn	P	Sr	Zn	Ca
Microesfera-FR	32	50	379	126	52	777	43	54	138
Pó-FR	454	762	167	615	135	1287	342	32	148

Fonte: Autoria própria

3.4 Testes de germinação

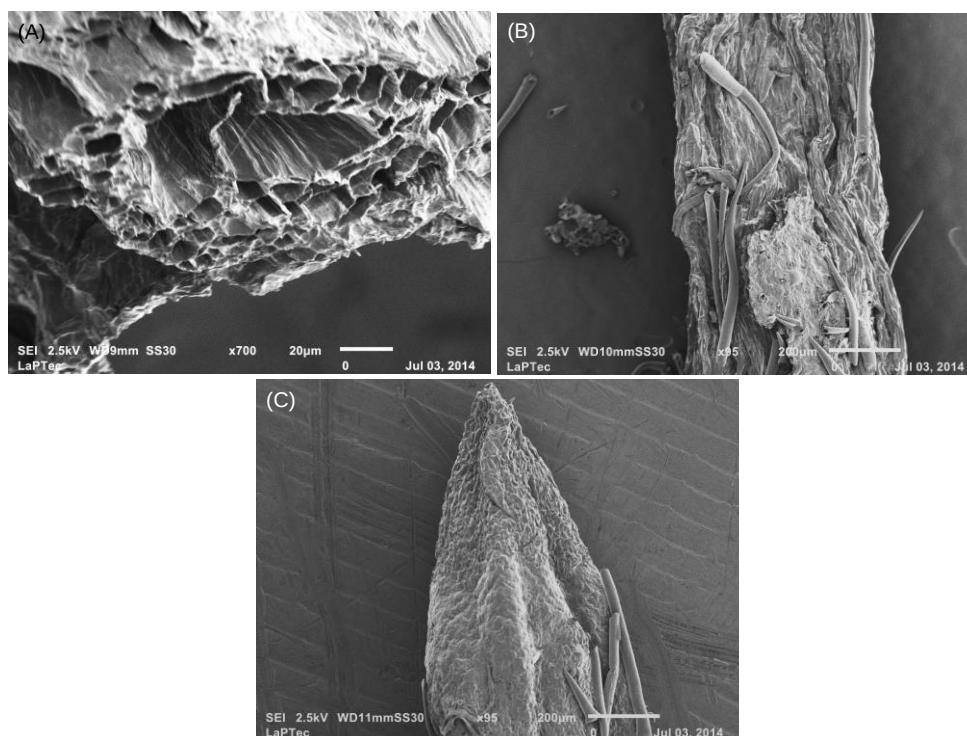
Sabe-se que o processo de germinação é desencadeado por eventos fisiológicos sequenciais que são modulados por fatores externos e internos à semente. Os testes de germinação realizados trataram apenas da influência modulada por fatores externos, visto que as sementes foram escolhidas e tiveram sua massa aferida previamente à plantação para procurar obter maior homogeneidade dos controles propostos. Um controle somente com o substrato (testemunha) (Figura 47) foi realizado para ser um parâmetro da variação negativa ou positiva da interação semente-substrato-*biochar*. Dessa forma, os experimentos realizados podem contribuir para melhorar a predição da capacidade de germinação e desenvolvimento de sementes de milho frente à exposição ao *biochar* e, assim, sugerir estratégias de manejo e aplicação mais eficientes. Na Figura 48 podem-se observar as estruturas principais da raiz de uma plântula germinada sem a presença de *biochar*, onde se nota a densidade vegetal, morfologia da coifa e desenvolvimento da zona pilosa.

Figura 47 – Controle: Plântulas germinadas a partir do substrato testemunha.



Fonte: Acervo Pessoal

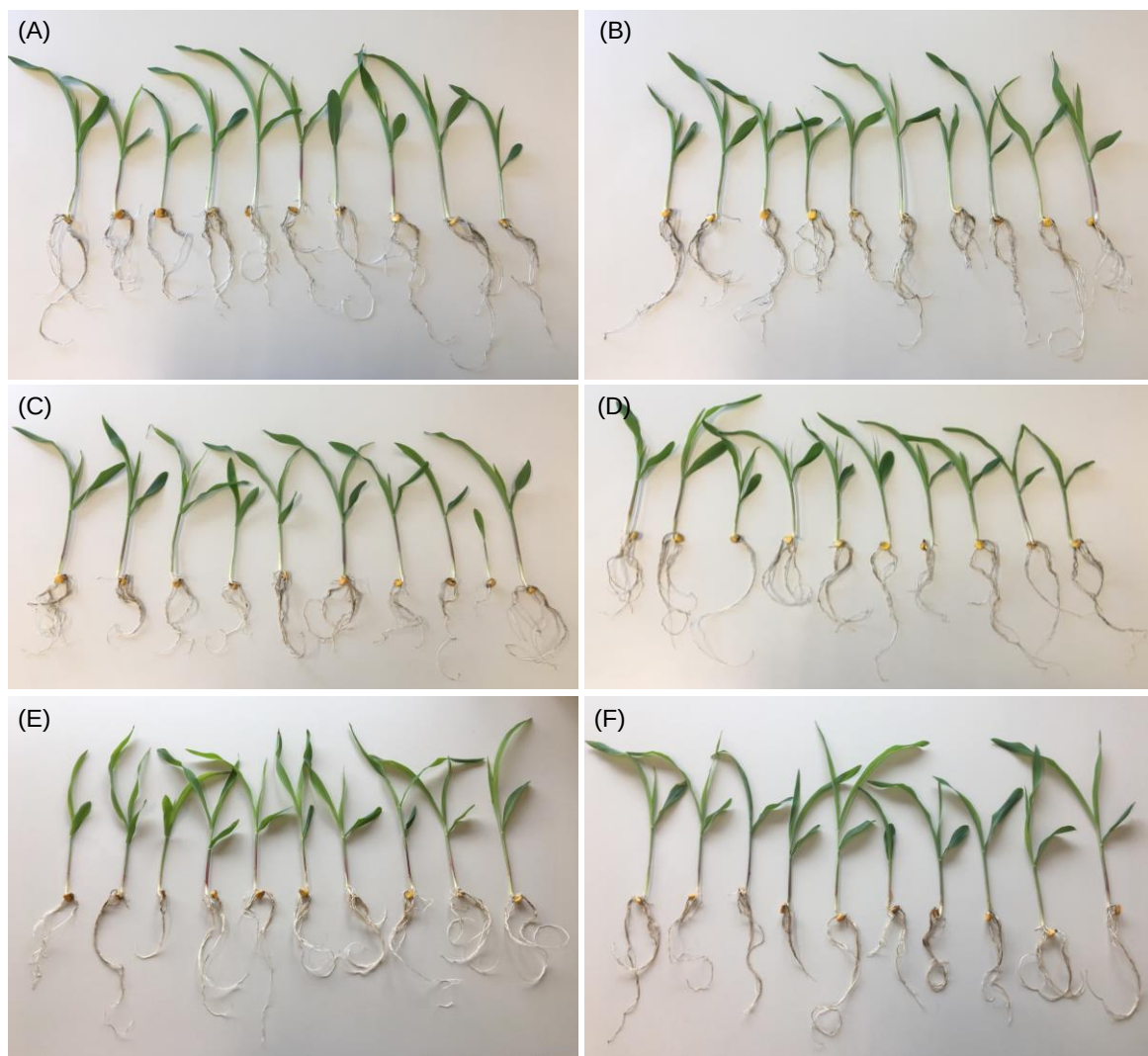
Figura 48 – Micrografias do material vegetal desenvolvimento em um ambiente sem *biochar* e sem substrato. (A) Corte lateral da radícula da plântula, mostrando a densidade do tecido vegetal; (B) zona pilífera e; (C) coifa.



Fonte: Acervo Pessoal

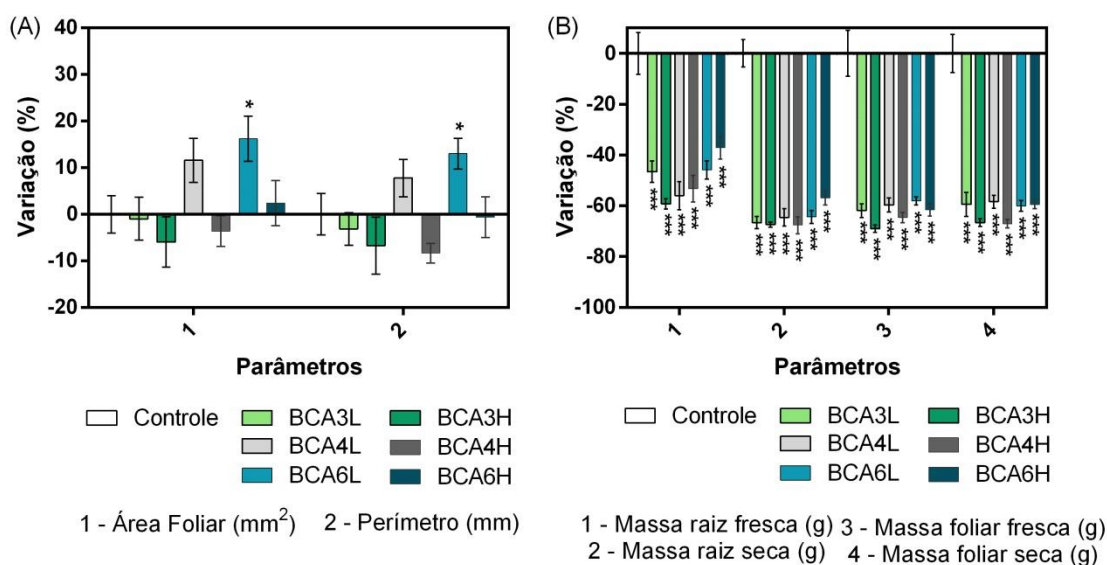
Na Figura 49 são mostradas as plântulas germinadas em ambientes nos quais foram aplicados em sulco *biochars* feitos a partir de BMCA. Os resultados quantitativos (Figura 50) mostram que o comportamento da germinação e desenvolvimento das sementes não foi completamente inibitório para a formação da parte aérea, mas foi para o sistema radicular. A grande maioria das plântulas apresentaram o desenvolvimento da primeira folha verdadeira, segunda lâmina foliar e verticilo (ponto do caule onde se insere um conjunto de peças foliáceas, também conhecido como nó).

Figura 49 – Plântulas germinadas a partir do substrato com aplicação de *biochars* produzidos a partir da biomassa de bagaço de cana-de-açúcar. (A) BCA3L; (B) BCA3H; (C) BCA4L; (D) BCA4H; (E) BCA6L e; (F) BCA6H.



Em relação ao controle, apenas os *biochars* BCA400 e BCA600 em baixas dosagens apresentaram variações positivas (11,6 e 16,2% para a área foliar e 7,8 e 13,1% para o perímetro foliar, respectivamente). Entretanto, efeitos antagônicos foram observados na produção de biomassa, atingindo uma variação negativa de até 70% para o tratamento com BCA3H.

Figura 50 – Efeito da de *biochar* produzidos a partir de BMCA sobre o desenvolvimento de sementes de milho, expresso em percentagem de variação em relação ao controle. Os *biochars* foram suplementados ao meio em concentrações de 0,4% ($w v^{-1}$, L) e 2% ($w v^{-1}$, H). * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$, de acordo com o teste LSD. O erro padrão da média ($n = 10$) também é indicado.

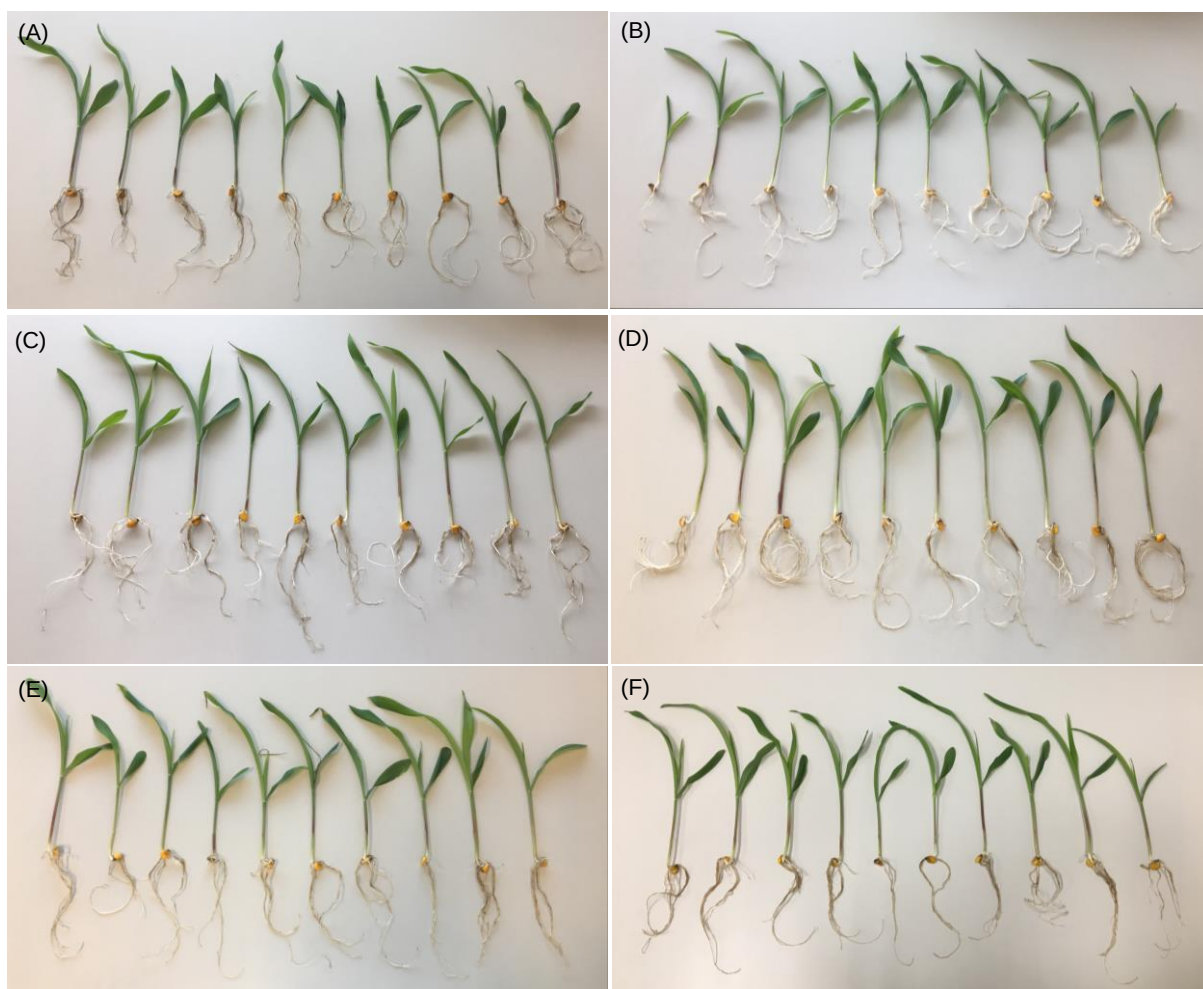


Fonte: Autoria própria

Os tratamentos a seguir foram executados nas mesmas condições, porém com *biochar* BCA encapsulado em esferas 3% de ALG (Figura 51). Os dados experimentais indicam que os compostos que atuam como sinalizadores químicos que afetam a germinação e o desenvolvimento das sementes são compostos extraíveis em água, visto que a produção de esferas envolvem vias húmidas. Nesses tratamentos, os comportamentos inibitórios independem da temperatura de pirólise e dosagem do *biochar*. Comparando os tratamentos que apresentaram variação positiva para a aplicação em sulco do pó de *biochar*, as amostras BCA4L

e BCA6L encapsulados mudaram para uma variação de -10,1% e -3,5% para a área foliar e -10,1% e 4,4% para o perímetro total.

Figura 51 – Plântulas germinadas a partir do substrato com aplicação de esferas de alginato contendo *biochars* produzidos a partir da biomassa de bagaço de cana-de-açúcar. (A) BCA3L; (B) BCA3H; (C) BCA4L; (D) BCA4H; (E) BCA6L e; (F) BCA6H.



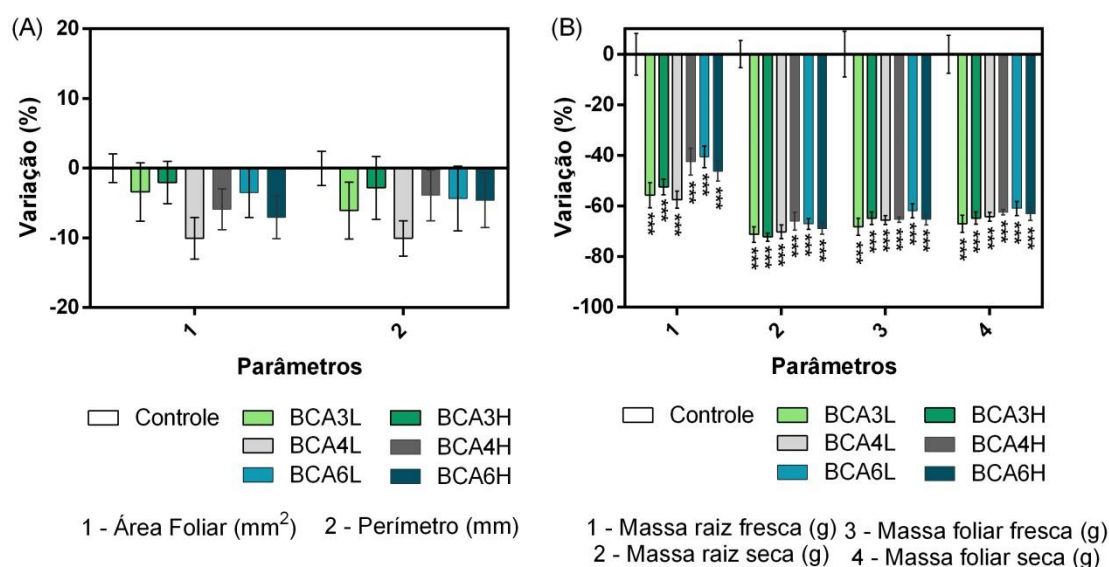
Fonte: Acervo pessoal

Existem poucos estudos investigando os efeitos diretos do *biochar* na formação qualitativa do sistema radicular de plantas. Os estudos apresentados neste trabalho indicam que as substâncias que influenciam negativamente a germinação e formação da zona radicular são relacionadas com a fração de carbono orgânico dissolvido presentes na superfície e estruturas

internas dos *biochars* e, portanto, podem indicar a formação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) durante a pirólise das biomassas (Rogovska *et al.*, 2012; Bargmann *et al.*, 2013). Os compostos possivelmente tóxicos presentes na fração de COD que se encontram disponíveis no substrato são assimiláveis pelas raízes via transporte ativo ou passivo por meio das membranas, através da difusão ou fluxo de massa, indicando que a encapsulação não é efetiva para barrar ou retardar a liberação de compostos tóxicos, visto que os resultados obtidos indicam que são compostos facilmente dissolvidos e transportados em água (Buss e Masek, 2016).

Logo, a variação negativa da massa fresca e seca do sistema radicular em relação ao controle ocorre como resposta aos sinais e gradientes do solo e, assim, acaba por minimizar o crescimento nessas áreas de interação direta com os compostos possivelmente tóxicos do *biochar*. Enquanto isso, o sistema da planta prioriza o crescimento em locais como as folhas com a maximização do envio de nutrientes, como se nota nas amostras BCA4L e BCA6L, que apresentaram variações positivas para área e perímetro foliar. Este fato é indicativo de fitotoxicidade no desenvolvimento das plantas de milho após a germinação, pois a germinação em si ocorre, em grande parte, devido aos nutrientes de reserva disponíveis no endosperma da semente, onde o meio externo só passa a exercer influência após a emergência das primeiras estruturas vegetais (Saxena *et al.*, 2013).

Figura 52 – Efeito da aplicação de esferas de *biochar* produzidos a partir de BMCA sobre o desenvolvimento de sementes de milho, expresso em percentagem de variação em relação ao controle. Os *biochars* foram suplementados ao meio em concentrações de 0,4% ($w v^{-1}$, L) e 2% ($w v^{-1}$, H). * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$, de acordo com o teste LSD. O erro padrão da média ($n = 10$) também é indicado.



Fonte: Autoria própria

A difusão dos compostos inibitórios extraíveis em água na zona de troca de massa e fluxo das esferas foi confirmada verificando as esferas ao término do experimento, onde as esferas mostram um teor de água de apenas 14,6%. Ou seja, a solução com os compostos passaram para o substrato, erodindo o formato das esferas (Figura 53), enquanto a porção sólida permaneceu encapsulada. Deste fato pode-se afirmar que o comportamento fitotóxico do *biochar* está relacionado, principalmente, com os compostos produzidos durante a reação de pirólise e que são passíveis de extração em água.

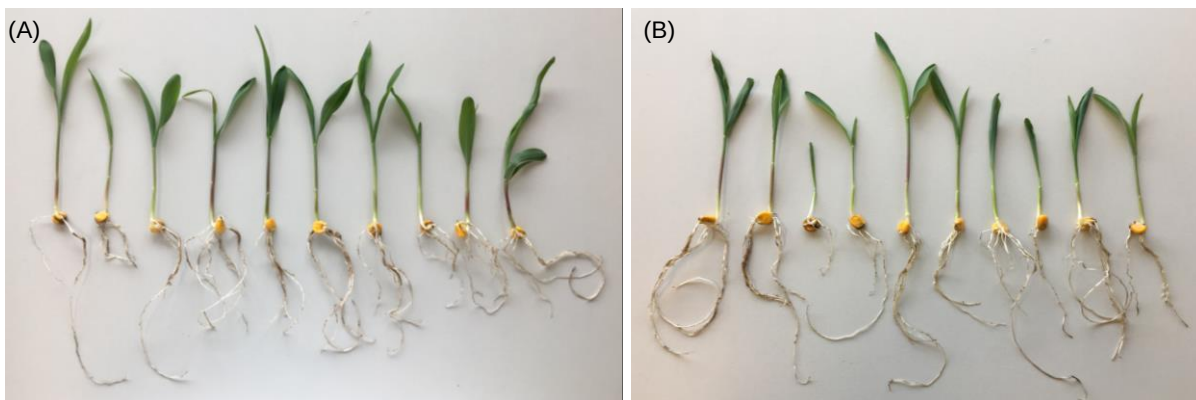
Figura 53 – Esferas recolhidas após o ensaio de germinação, mostrando que a porção aquosa foi liberada, permanecendo a porção sólida encapsulada.



Fonte: Autoria própria

Soluções com amostras de BCA3L e BCA3H foram autoclavadas para a produção de esferas e, assim, verificar o efeito da liberação induzida e acelerada dos compostos presentes nas estruturas do biochar na germinação. Na Figura 54 é possível verificar que todas as plântulas germinadas não apresentaram a mesma taxa de desenvolvimento apresentadas pelos controles anteriores, apresentando, em alguns casos, o coleóptilo com a plúmula fechada (planta embrionária).

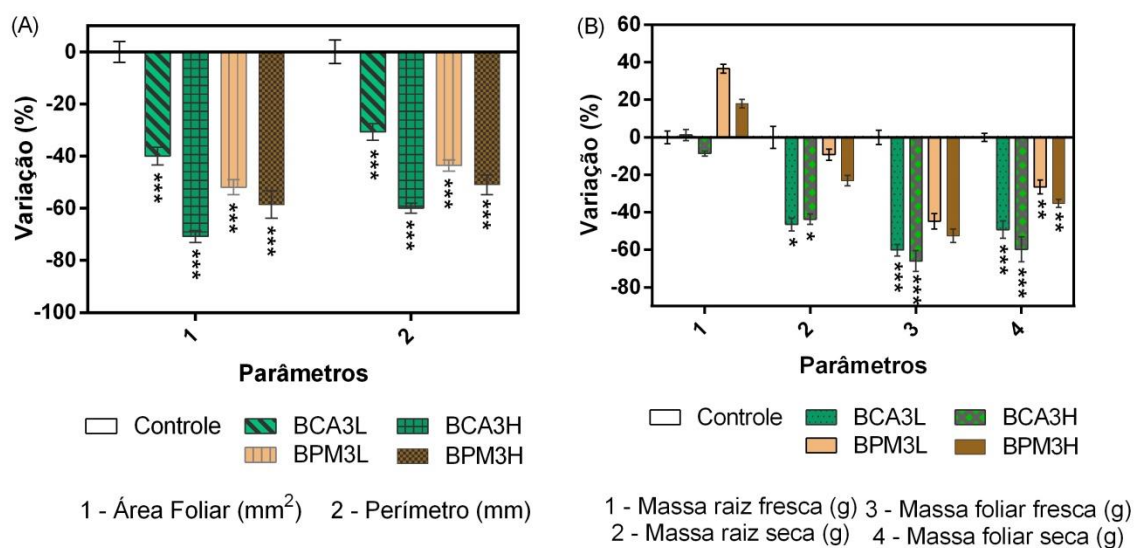
Figura 54 – Plântulas germinadas a partir do substrato com aplicação de esferas de alginato contendo *biochars* autoclavados produzidos a partir da biomassa de bagaço de cana-de-açúcar. (A) BCA3L e; (B) BCA3H.



Fonte: Acervo pessoal

Na quantificação dos dados obtidos nesses tratamentos pode-se verificar a influência da dosagem no desenvolvimento do sistema radicular e, conseqüentemente, na produção de massa fresca da área radicular, o que é notado pelas fotos mostradas anteriormente. O tratamento com BCA3H autoclavado apresentou variações positivas na produção de massa da raiz. Supostamente, as altas temperaturas e pressão envolvidas no processo de autoclavagem promoveram a liberação de compostos presos mais interiormente na estrutura do *biochar*. Como o efeito foi diretamente no desenvolvimento do sistema radicular, supõe-se que houve formação e liberação de etileno durante a pirólise e este composto, um hidrocarboneto alifático presente quando a combustão é incompleta, foi liberado na solução do substrato, pois a Tríplice Reação de Neljubov foi verificada: restrição no alongamento, aumento do crescimento radial (entumescimento) e crescimento horizontal radicular. Sabe-se que o etileno é um importante fitohormônio, bem como inibidor de processos microbianos que ocorrem no solo e um produto resultante da combustão incompleta de compostos ricos em carbono e já foi relatada sua formação nas estruturas de *biochar* (Spokas *et al.*, 2010). Mesmo em baixas concentrações ($0,05 \mu\text{L L}^{-1}$) é sabido que o etileno pode influenciar vários processos biológicos (Gamalero e Glick, 2015), pois ele se liga em um receptor presente nas membranas do retículo endoplasmático, inibindo a ativação de uma proteína que, conseqüentemente, inibe a expressão de genes responsáveis pela formação da planta. Outra hipótese sustentada é que as próprias plantas geram altos níveis de etileno sob condições de estresse abiótico, acumulando esse composto na região da rizosfera e, assim, a elongação da raiz é inibida, reduzindo assim a absorção de água e nutrientes e a produção de biomassa das plantas (Hale *et al.*, 2015).

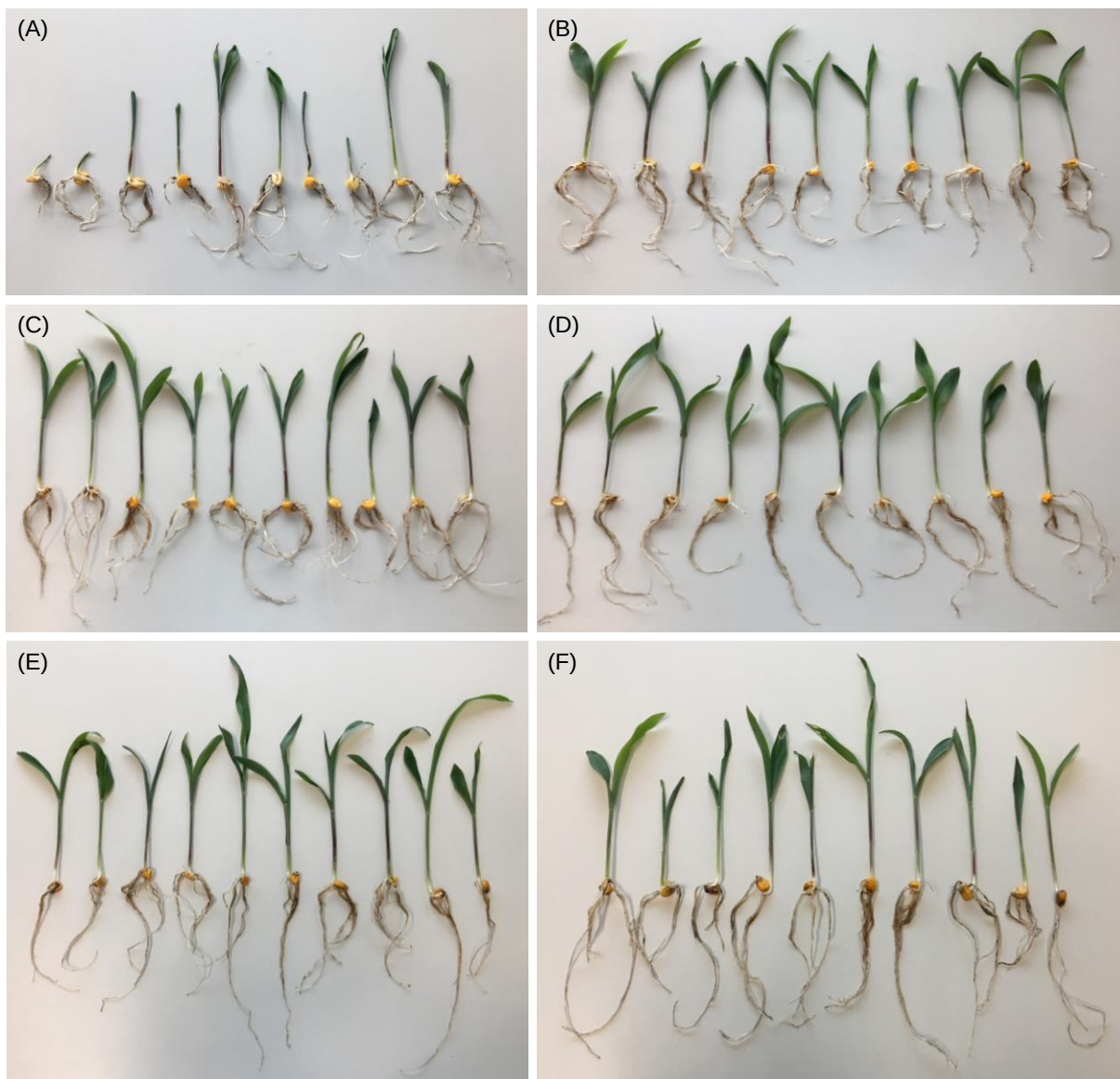
Figura 55 – Efeito da aplicação de esferas de *biochar* autoclavados produzidos a partir de BMCA sobre o desenvolvimento de sementes de milho, expresso em percentagem de variação em relação ao controle. Os *biochars* foram suplementados ao meio em concentrações de 0,4% (w v⁻¹, L) e 2% (w v⁻¹, H). * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001, de acordo com o teste LSD. O erro padrão da média (n = 10) também é indicado.



Fonte: Autoria própria

Para os experimentos tratados com a aplicação de *biochars* produzidos a partir de BMCA (Figura 56), nota-se que a grande maioria das plântulas tratadas com *biochars* produzidos em baixas temperaturas apresentou somente a formação da primeira folha verdadeira e segunda lâmina foliar. O bom desenvolvimento das sementes nesse período é importante, pois no estágio vegetativo V2 e, principalmente V3, é que todas as folhas e espigas que serão produzidas pela planta estão sendo formadas nesses estádios iniciais (Ritchie *et al.*, 2003). Dessa forma, o estabelecimento do número máximo de grãos e, portanto, da produção da cultura, estão sendo determinados neste ponto (Magalhães e Durães, 2002). Logo, se houver a presença de aleloquímicos, como compostos fenólicos, por exemplo, nos primeiros estádios vegetativos do milho, a sinalização química pode ser traduzida e afetar de forma negativa todos os estádios vegetativos e reprodutivos subsequentes.

Figura 56 – Plântulas germinadas a partir do substrato com aplicação em sulco de *biochars* produzidos a partir da biomassa de palha de milho. (A) BPM3L; (B) BPM3H; (C) BPM4L; (D) BPM4H; (E) BPM6L e; (F) BPM6H.

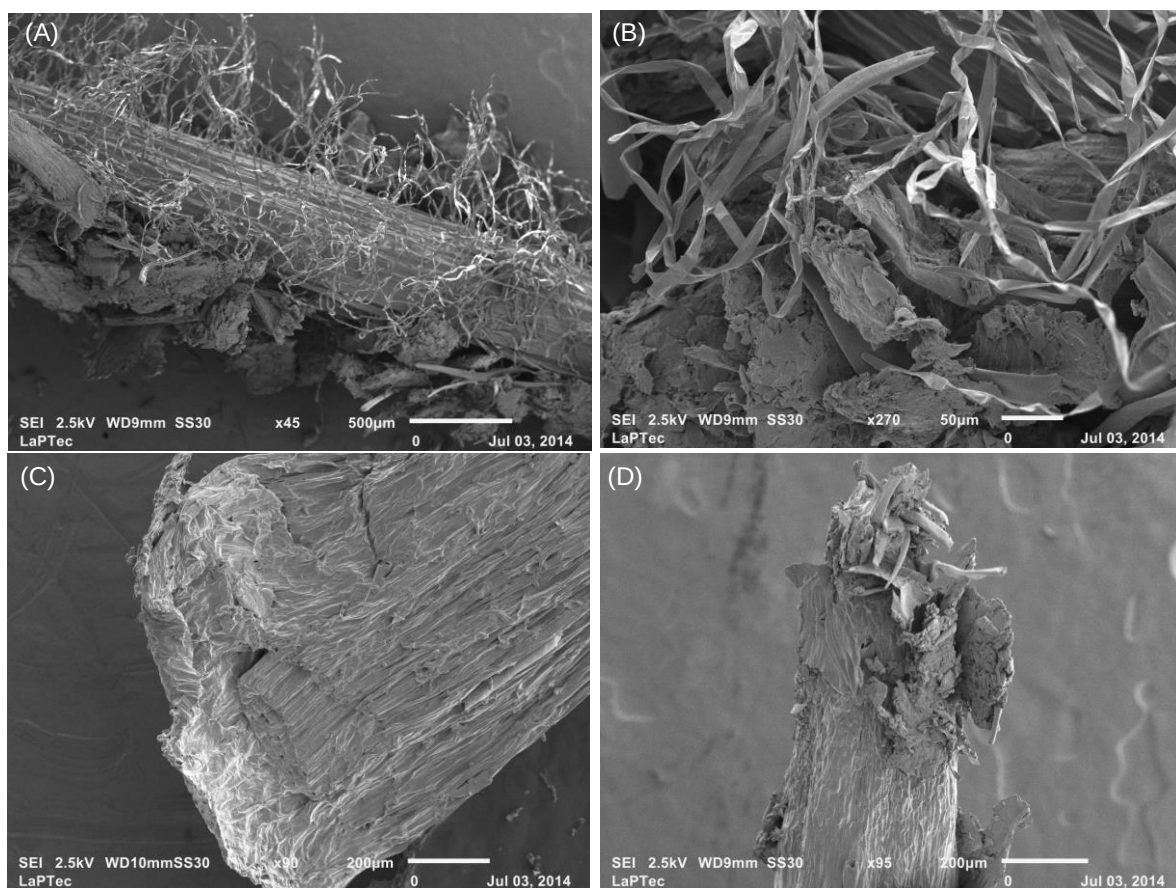


Fonte: Acervo pessoal

Quando o *biochar* é inserido no sistema solo-planta a sua interação com o sistema radicular é constatada, como mostra as micrografias da Figura 57. Na Figura 57(B) percebe-se que grande área da zona pilífera adsorve as partículas de *biochar* quimicamente ou até mesmo fisicamente, penetrando em sua estrutura porosa. Logo, a presença de etileno nas estruturas

internas consegue afetar diretamente na ampliação das raízes. A coifa (Figura 57D) também mostrou grande afinidade com as partículas de *biochar*.

Figura 57 – Micrografias do material vegetal na presença de *biochars* de BMPM produzido à 300°C (teste sem substrato). A interação *biochar*-planta mostrou efeitos como (A) desenvolvimento da zona pilífera; (B) alta interação do *biochar* com o micropêlos; (C) aumento da densidade da radícula (corte lateral) quando comparada ao controle sem a presença de *biochar* e; (D) interação da coifa com o *biochar*.



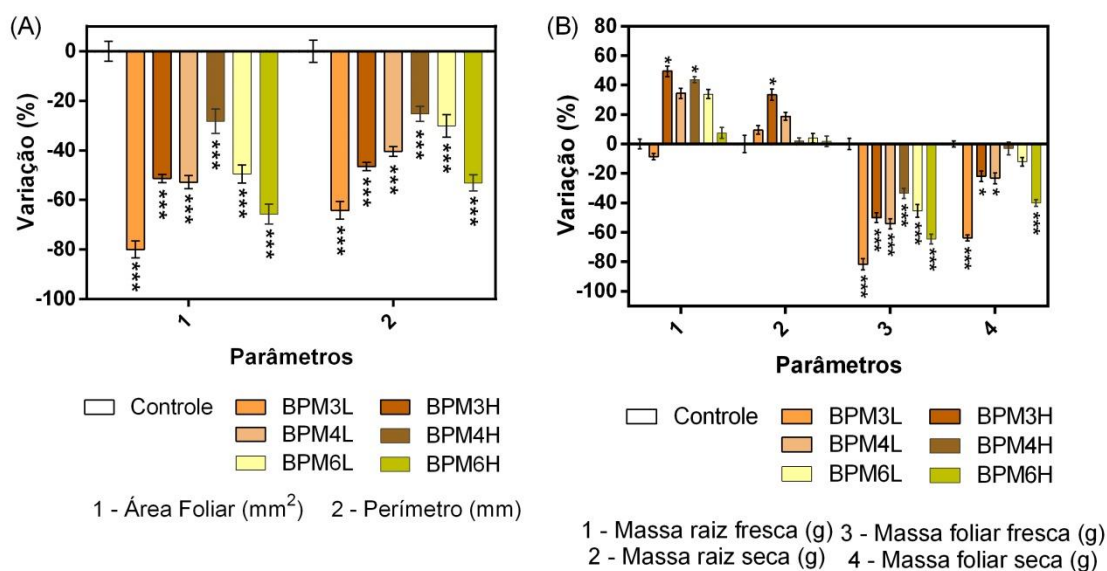
Fonte: Acervo Pessoal

A hipótese da formação de etileno na pirólise pode explicar também o efeito inibitório nas cepas de fungos e bactérias testadas neste trabalho, visto que há relatos desta natureza descrito na literatura (Cherdchim e Satansat, 2016).

A Figura 58 mostra os efeitos da aplicação de *biochars* BPM na germinação e desenvolvimento de sementes de milho. Para os tratamentos com BPM400 e BPM600 a dosagem influenciou na produção de massa fresca e seca do sistema radicular, indicando também a

hipótese da presença de etileno nos *biochars* produzidos a partir de BPM. Entretanto, para as outras variáveis investigadas, os efeitos se mostraram altamente inibitórios, principalmente para os tratamentos com BPM3L e BPM 3H que atingiram uma variação negativa de -80,0% para a área foliar total e -64,2% para o perímetro foliar em comparação com a testemunha do experimento.

Figura 58 – Efeito da aplicação de *biochar* produzidos a partir de BPM sobre o desenvolvimento de sementes de milho, expresso em percentagem de variação em relação ao controle. Os *biochars* foram suplementados ao meio em concentrações de 0,4% (w v⁻¹, L) e 2% (w v⁻¹, H). * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001, de acordo com o teste LSD. O erro padrão da média (n = 10) também é indicado.



Fonte: Autoria própria

Para os resultados vistos até aqui, percebe-se que ainda existem muitas incertezas no uso e na literatura para os índices de qualidade agrônômica acerca do *biochar*. Assim, a correlação calculada entre os dados de germinação e desenvolvimento das sementes de milho com as características físicas e químicas dos *biochars* é importante para definir o melhor uso/ destinação desses materiais carbonáceos acerca dos comportamentos que mais influenciam no fluxo de energia e matéria do sistema solo-planta-microorganismos. A Tabela 9 mostra os resultados de correlação obtidos para os dados de germinação com aplicação em sulco dos *biochars*.

Tabela 9 - Análise de correlação entre desenvolvimento de sementes de milho na presença de *biochar* e as características físico-químicas dos materiais. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$, de acordo com o teste LSD. $\emptyset$ = correlação não significativa.

Correlação das Variáveis		Variáveis Analisadas - Plântulas		
		Área	Perímetro	Produção de Massa Seca
pH		**(-)	**(-)	**(-)
Boehm	Carboxílicos	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	Lactônicos	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	Fenólicos	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	Básicos	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
RMN	Carbonila	**(-)	**(-)	**(-)
	Alquila	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	Tot Arom C	$\emptyset$	*	$\emptyset$
	C(non-prot)	$\emptyset$	*	$\emptyset$
	C(prot)	**(-)	*	$\emptyset$
BET	C Constante	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	Área Esp. Sup.	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	Superf. Total	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	Superf. Micro.	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	Superf. Exter	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	Microp Vol _G	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	Microp Vol _L	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
EDS	C	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	N	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	O	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	Mg	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	Si	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	Ca	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	K	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
	Mn	*(-)	*(-)	$\emptyset$
	C/N	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
COD		**	**	$\emptyset$
Molhabilidade		$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$

Fonte: Autoria própria

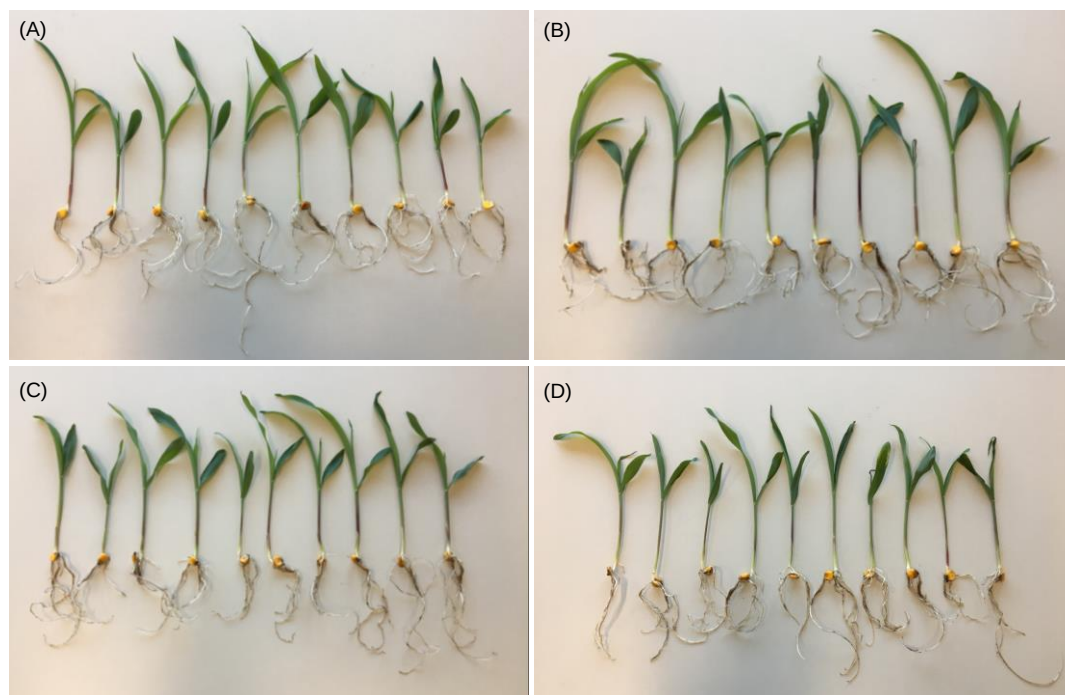
Pelos dados obtidos, as características intrínsecas dos *biochars* que mais influenciam na formação foliar (medida do perímetro foliar total) das plântulas são os teores de carbono aromático total, incluindo os carbonos protonados e a quantidade de carbono orgânico dissolvido disponível na solução do substrato para cada tipo e dosagem de *biochar*. Essa mesma correlação já foi encontrada e relatada na literatura para a germinação de sementes de algodão em sistemas com aplicação de *biochar* comercial (Bargmann *et al.*, 2013). A correlação com dados de pH

apresentou uma correlação significativa negativa para todas as variáveis avaliadas, bem como o teor de carbonilas.

Também foram avaliados sistemas com a presença de fosfato de rocha e *biochar*. Nesses tratamentos, a aplicação foi realizada a lanço para aumentar o contato do substrato com o fertilizante e condicionante (*biochar*).

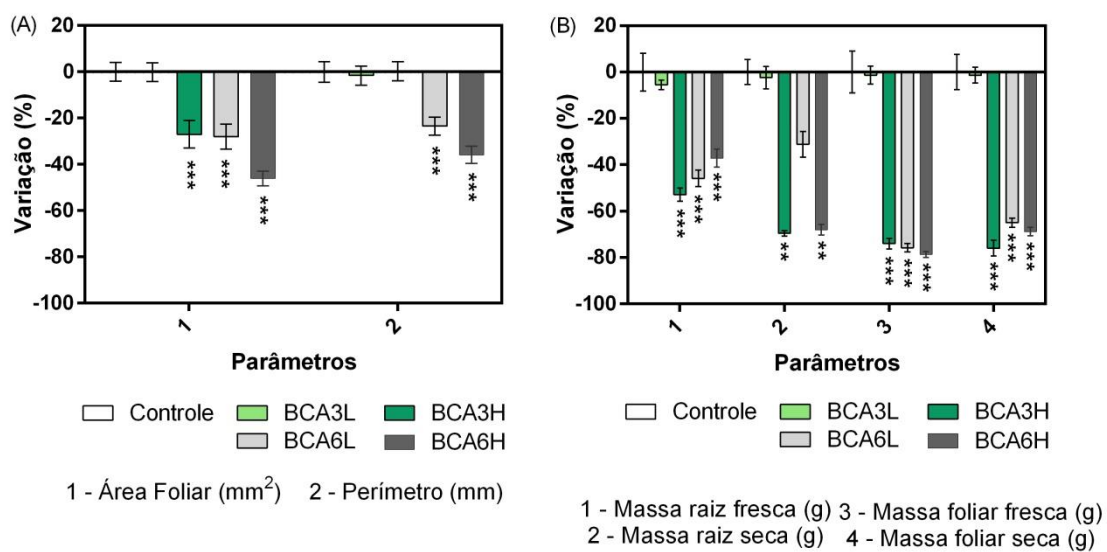
A mudança na forma de aplicação do *biochar* nos tratamentos influenciou diretamente na sua interação substrato-planta. Para ambos os *biochars* (BMPMs e BMCAs – Figuras 59 a 62), para o mesmo período de experimento, o *biochar* aplicado a lanço não afetou o fluxo de matéria e energia na proporção que afetou quando foi aplicado em sulco quando se observa os efeitos na área e perímetro foliar. Ou seja, o sistema criado não permitiu que os *biochars* liberassem, na mesma taxa, os compostos inibitórios e de favoráveis e, assim, não modificaram o teor de matéria orgânica disponível no solo (Smebye *et al.*, 2016). Os resultados também indicaram que a presença de FR não provocou alterações significantes sobre a produção de massa fresca e seca das raízes e folhas, provavelmente devido ao pH do substrato ($\sim 7,0$).

Figura 59 – Plântulas germinadas a partir do substrato com aplicação de *biochars* produzidos a partir da biomassa de bagaço de cana-de-açúcar e fosfato de rocha. (A) BCA3L-FR; (B) BCA3H-FR; (C) BCA6L-FR e; (D) BCA6H-FR.



Fonte: Acervo pessoal

Figura 60 – Efeito da aplicação via irrigação de *biochar* produzidos a partir de BMCA com adição de FR sobre o desenvolvimento de sementes de milho, expresso em porcentagem de variação em relação ao controle. Os *biochars* foram suplementados ao meio em concentrações de 0,4% ($w v^{-1}$, L) e 2% ($w v^{-1}$, H). * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$, de acordo com o teste LSD. O erro padrão da média ($n = 10$) também é indicado.



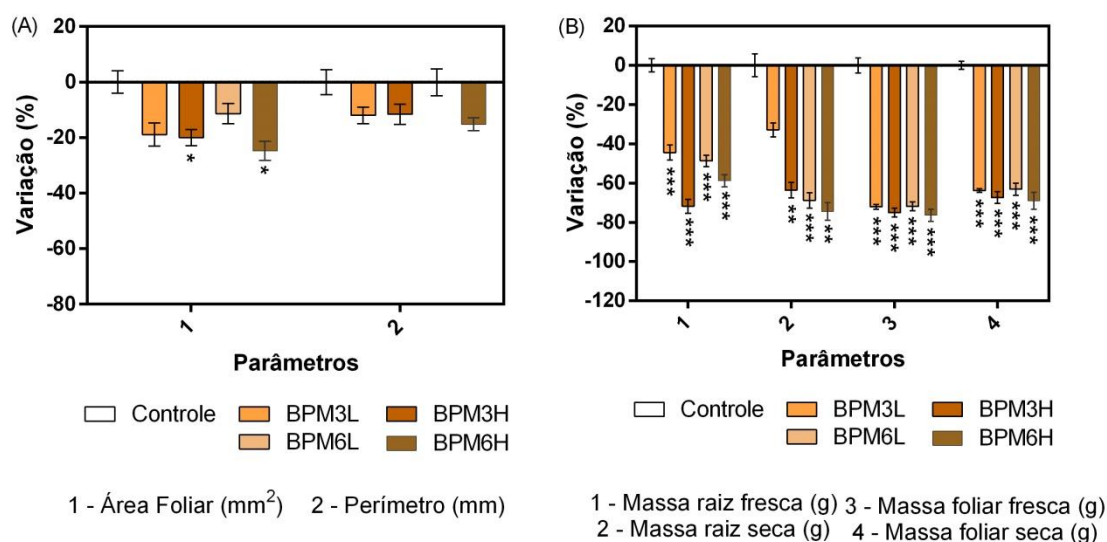
Fonte: Autoria própria

Figura 61 – Plântulas germinadas a partir do substrato com aplicação via sulco de *biochars* produzidos a partir da biomassa de bagaço de cana-de-açúcar e fosfato de rocha via irrigação. (A) BPM3L-FR; (B) BPM3H-FR; (C) BPM6L-FR e; (D) BPM6H-FR.



Fonte: Acervo pessoal

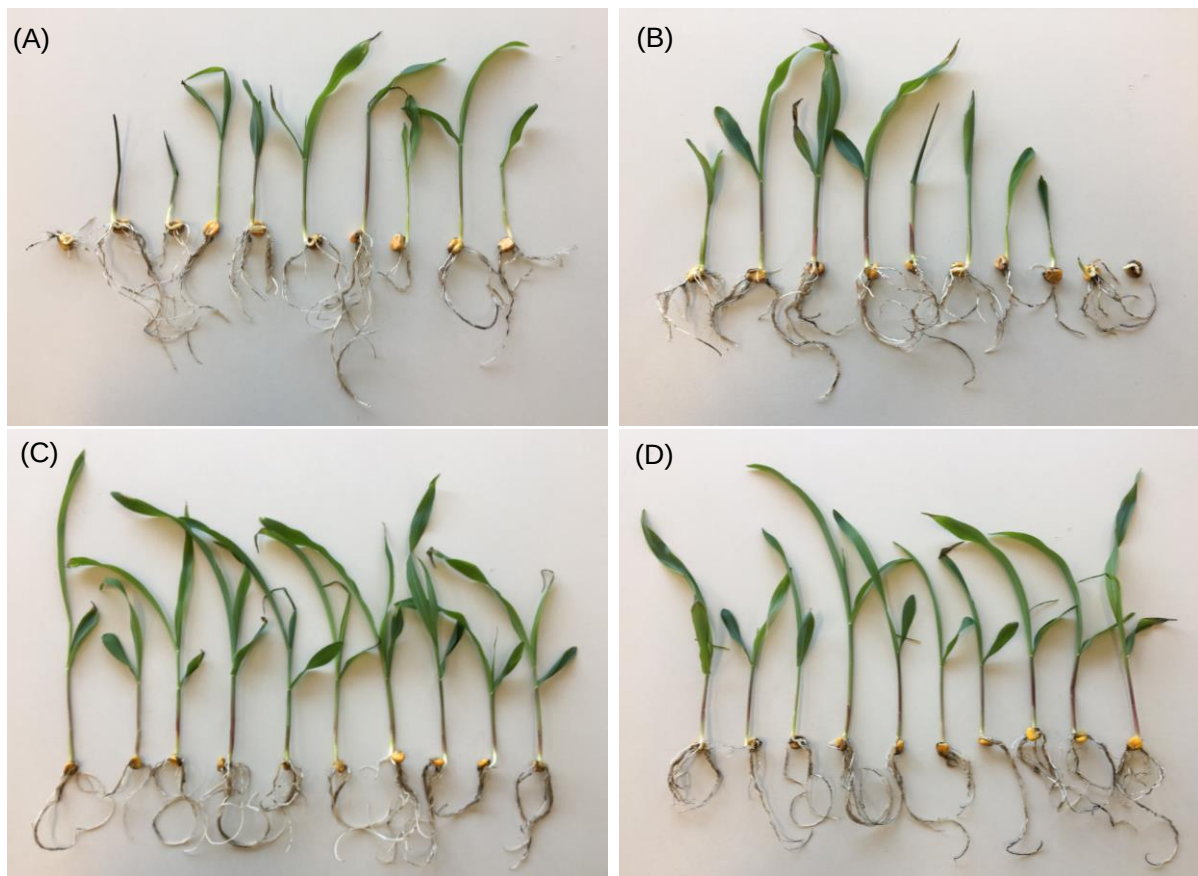
Figura 62 – Efeito da aplicação via irrigação de *biochar* produzidos a partir de BMCA com adição de FR sobre o desenvolvimento de sementes de milho, expresso em porcentagem de variação em relação ao controle. Os *biochars* foram suplementados ao meio em concentrações de 0,4% (w v⁻¹, L) e 2% (w v⁻¹, H). * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001, de acordo com o teste LSD. O erro padrão da média (n = 10) também é indicado.



Fonte: Autoria própria

Por fim, procedeu-se experimentos de germinação com tratamentos onde sementes de milho foram inoculadas com EPS não purificadas obtidas da interação *biochar-Bacillus sp.* A Figura 63 mostra as plântulas resultantes desses tratamentos e é possível verificar que as sementes inoculadas com EPS originadas da interação com *biochars* de BMPM se mostram mais vigorosas, comparadas com as amostras de BMCA.

Figura 63 – Plântulas germinadas a partir do substrato com aplicação de sementes inoculadas com exsudados bacterianos produzidos a partir da incubação de CMAA-1423 (*Bacillus sp.*) com *biochars* de: (A) BCA3L-BIO; (B) BCA6L; (C) BPM3L e; (D) BPM6L.



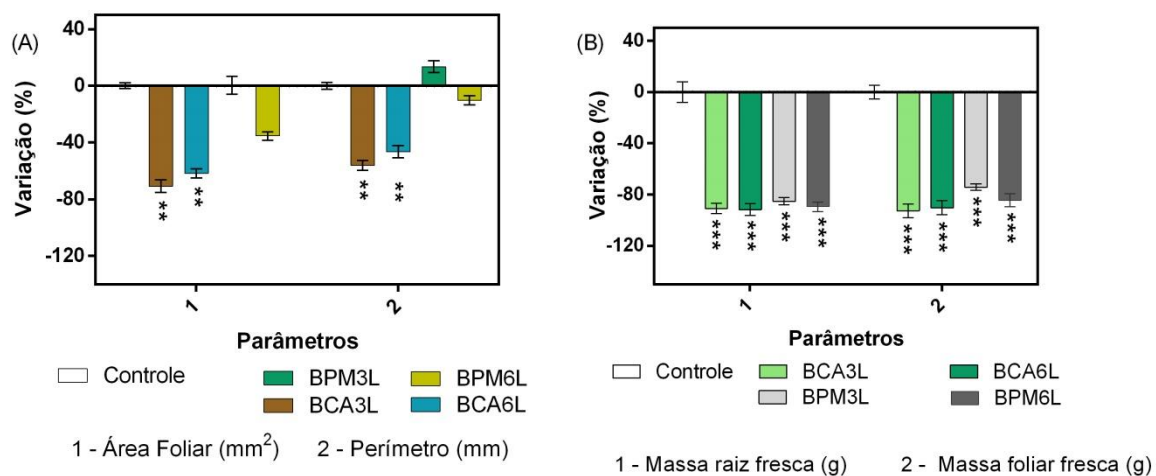
Fonte: Acervo pessoal

Os resultados quantitativos obtidos (Figura 63) mostram que os tratamentos obtidos com BPM3L mostrou uma variação positiva, mas não significativa, em relação à testemunha: 0,41% para a área foliar e 13,5% para o perímetro foliar total. Este dado é oposto ao encontrado quando BPM3L foi aplicado em sulco e em pó, onde apresentou comportamento inibitório, com variações negativas alcançando 80%, indicando que a forma como o *biochar* é aplicado e utilizado para condicionamento/ fertilização, pode influencia também nos mecanismos de toxicidade.

O que pode ter ocorrido nas EPS geradas por *biochars* BMPM é explicado pelos espectros de nano-infravermelho, onde picos de lipídeos e proteínas, não vistos para as EPS de *biochars*

BMCA, estão presentes. Assim, no que diz respeito aos mecanismos bioquímicos, a presença de proteínas, que é frequentemente relacionada com a estabilidade da água nos agregado do solo (Wright e Upadhyaya, 1998), pode ter agido como um material polimérico condicionando o ambiente químico circundante de forma favorável (Bender e Phillips, 2004).

Figura 64 – Efeito da aplicação de sementes inoculadas com exsudados bacterianos produzidos a partir da incubação de CMAA-1423 (*Bacillus sp.*) com *biochars* sobre o desenvolvimento de sementes de milho, expresso em percentagem de variação em relação ao controle. Os *biochars* foram suplementados ao meio em concentrações de 0,4% (w v⁻¹, L) e 2% (w v⁻¹, H). * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001, de acordo com o teste LSD. O erro padrão da média (n = 10) também é indicado.



Fonte: Autoria própria

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para cada situação analisada percebeu-se que a temperatura de pirólise, biomassa de origem e dosagem aplicada são variáveis que precisam ser analisadas caso a caso de acordo com o tipo de solo a ser aplicado, microorganismos nativos e cultura a ser tratada. É necessário levar em conta que os efeitos inibitórios observados no desenvolvimento de sementes de milho neste trabalho, quando transferidos para o campo, podem ser diluídos dadas as proporções adequadas. Mas mesmo assim não dever ser desconsiderados, frente às grandes taxas de efeitos negativos observados nos fungos, bactérias e desenvolvimento de sementes.

Observou-se, em geral, uma rede de efeitos negativos, particularmente para as massas aferidas do sistema radicular. Este dado mostra o efeito claro que o *biochar* tem no estabelecimento das raízes de plantas e, em casos de fitotoxicidade, as raízes podem priorizar e maximizar o envio de nutrientes para a parte aérea, mostrando assim um falso efeito positivo do *biochar* no aumento da produção de biomassa. Esses resultados suportam a hipótese que as condições nas quais a pirólise é conduzida são importantes, visto que podem afetar diretamente a formação e liberação de compostos fitotóxicos presentes na estrutura do *biochar*. Esses resultados também mostram que por meio da irrigação, os compostos que causam toxicidade podem ser facilmente dissolvidos em água e transportados por ela até alcançar as estruturas vegetativas presentes no solo e microbiota.

Considerando o conjunto de dados obtidos, deve-se enfatizar que os *biochars*, como outros insumos agrícolas, devem analisados de forma criteriosa antes de serem aplicados no sistema pedológico sem análises prévias. Da mesma forma, normas relativas ao conteúdo de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e outros compostos possivelmente tóxicos presentes no *biochar* devem ser estabelecidas e levadas em consideração aos resultados negativos e inibitórios obtidos nos testes microbiológicos e de germinação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(EPA), U. E. P. A. Method 9045D - Soil and waste pH. **9000 Series Methods - Test Methods - Wastes - US EPA**, 2004.

ABIVEN, S.; SCHMIDT, M. W. I.; LEHMANN, J. Biochar by design. **Nature Geoscience**, v. 7, n. 5, p. 326-327, May 2014.

ADRADOS, A. et al. Upgrading of pyrolysis vapours from biomass carbonization. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 103, p. 293-299, Sep 2013.

AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mechanisms involved in the biodegradation of lignocellulosic materials and related technological applications. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1729-1738, 2011.

AGUILAR-CHAVEZ, A. et al. Greenhouse gas emissions from a wastewater sludge-amended soil cultivated with wheat (*Triticum spp. L.*) as affected by different application rates of charcoal. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 52, p. 90-95, Sep 2012.

AHMAD, M. et al. Effects of pyrolysis temperature on soybean stover- and peanut shell-derived biochar properties and TCE adsorption in water. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 536-544, Aug 2012. ISSN 0960-8524.

AHMAD, M. et al. Trichloroethylene adsorption by pine needle biochars produced at various pyrolysis temperatures. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 615-622, Sep 2013.

AHMAD, M. et al. Effects of soil dilution and amendments (mussel shell, cow bone, and biochar) on Pb availability and phytotoxicity in military shooting range soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 79, p. 225-231, May 1 2012.

AHMAD, M. et al. Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: A review. **Chemosphere**, v. 99, p. 19-33, Mar 2014.

AL-WABEL, M. I. et al. Pyrolysis temperature induced changes in characteristics and chemical composition of biochar produced from conocarpus wastes. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 374-379, Mar 2013.

ALHO, C. F. B. V. et al. Using Solid-State ^{13}C NMR to Study Pyrolysis Final Temperature Effects on Biochar Stability. In: XU J., W. J., HE Y. (Ed.). **Functions of Natural Organic Matter in Changing Environment**. Dordrecht Springer, 2013. p.1007-1011.

ALMEIDA, J. A.; ERNANI, P. R. Influência do solvente, da relação solo/solvente, e da incubação das amostras úmidas na variação do pH de solos catarinenses. **Ciência Rural**, v. 26, n. 1, p. 81-85, 1996.

ALMEIDA, P. C. **Extração de cromenos a partir de Ageratum conyzoides L.: Identificação química e modelagem matemática do processo**. 2015. 65 (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

AMONETTE, J. E.; JOSEPH, S. Characteristics of Biochar: Microchemical Properties. In: LEHMANN, J. e JOSEPH, S. (Ed.). **Biochar for environmental management: science and technology**. 1st. Washington, DC: Earthscan, 2009. cap. 3.

ANDERSON, C. R. et al. Biochar induced soil microbial community change: Implications for biogeochemical cycling of carbon, nitrogen and phosphorus. **Pedobiologia**, v. 54, n. 5-6, p. 309-320, 2011.

ANGIN, D. Effect of pyrolysis temperature and heating rate on biochar obtained from pyrolysis of safflower seed press cake. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 593-597, Jan 2013.

ANTAL, M. J.; GRONLI, M. The art, science, and technology of charcoal production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 42, n. 8, p. 1619-1640, Apr 16 2003.

ANTONIO ALBURQUERQUE, J. et al. Enhanced wheat yield by biochar addition under different mineral fertilization levels. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 33, n. 3, p. 475-484, Jul 2013. ISSN 1774-0746.

AOUADA, F. A.; MATTOSO, L. H. C. Hidrogéis Biodegradáveis: uma opção na aplicação como veículos carreadores de sistemas de liberação controlada de pesticidas. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento - EMBRAPA**, v. 28, p. 1-32, 2009.

ARAÚJO, A. C. C. **Composição química monomérica da lignina da madeira de Eucalyptus spp. para produção de carvão vegetal**. 2015. 85 (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia da Madeira, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

- ASCOUGH, P. L.; STURROCK, C. J.; BIRD, M. I. Investigation of growth responses in saprophytic fungi to charred biomass. **Isotopes in Environmental and Health Studies**, v. 46, p. 64-77, 2010.
- BAI, M. et al. Degradation kinetics of biochar from pyrolysis and hydrothermal carbonization in temperate soils. **Plant Soil**, v. 372, p. 375–387, 2013.
- BAKER, M. J. et al. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. **Nature Protocols**, v. 9, p. 1771–1791, 2014.
- BANDOSZ, T. **Activated carbon surfaces in environmental remediation**. Amsterdam, The Netherlands: Academic Press: 588 p. 2006.
- BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa: Editora UFV, 2007. 189.
- BARGMANN, I. et al. Hydrochar and Biochar Effects on Germination of Spring Barley. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 199, n. 5, p. 360-373, Oct 2013..
- BEN, H.; RAGAUSKAS, A. J. Comparison for the compositions of fast and slow pyrolysis oils by NMR characterization. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 577–584, 2013.
- BENDER, J.; PHILLIPS, P. Microbial mats for multiple applications in aquaculture and bioremediation. **Bioresource Technology**, v. 94, p. 229-238, 2004.
- BERNINGER, T.; MITTER, B.; PREININGER, C. The smaller, the better? The size effect of alginate beads carrying plant growth-promoting bacteria for seed coating. **Journal of Microencapsulation**, v. 33, p. 127-136, 2016.
- BIALOPIOTROWICZ, T. Wettability of starch gel films. **Food Hydrocolloids**, v. 17, n. 2, p. 141-147, Mar 2003.
- BOATENG, A. A.; MULLEN, C. A. Fast pyrolysis of biomass thermally pretreated by torrefaction. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 100, p. 95-102, Mar 2013.
- BOEHM, H. P. Some aspects of the surface chemistry of carbon blacks and other carbons. **Carbon**, v. 32, n. 5, p. 759-769, 1994.

BRANÀ, M. T. et al. Bioremediation of aflatoxin B1-contaminated maize by king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*). **PlosOne**, v. 00, n. 00, p. 1, 2017.

BRENNAN, A. et al. Effects of biochar amendment on root traits and contaminant availability of maize plants in a copper and arsenic impacted soil. **Plant and Soil**, v. 379, n. 1-2, p. 351-360, Jun 2014.

BRESSEL, T. A. B. **Sistema Gerador de Microcápsulas de Alginato**. 2007. 70 (Tese de Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BREWER, C. E. et al. New approaches to measuring biochar density and porosity. **Biomass and Bioenergy**, v. 66, p. 176-185, 2014.

BROCKHOFF, S. B. et al. Physical and mineral-nutrition properties of sand-based turfgrass root zones amended with biochar. **Agronomy Journal**, v. 102, p. 1627-1631, 2010.

BROWN, R. Biochar Production Technology. In: JOSEPH, J. L. A. S. (Ed.). **Biochar for Environment Management – Science and Technology**. London, United Kingdom: Earthscan, 2010. cap. 8, p.127-146.

BROWNSORT, P. et al. **Pyrolysis Biochar Systems - Pilot-Scale Pyrolysis Plant for 'Specified Biochar' Production**. 19th European Biomass Conference and Exhibition. Berlin, Germany: 1-4 p. 2011.

BRUUN, E. W. et al. Influence of fast pyrolysis temperature on biochar labile fraction and short-term carbon loss in a loamy soil. **Biomass & Bioenergy**, v. 35, n. 3, p. 1182-1189, Mar 2011.

BUDAI, A. et al. Biochar persistence, priming and microbial responses to pyrolysis temperature series. **Biology and Fertility of Soils**, v. 52, p. 749-761, 2016.

BUSS, W.; MASEK, O. Mobile organic compounds in biochar - A potential source of contamination - Phytotoxic effects on cress seed (*Lepidium sativum*) germination. **Journal of Environmental Management**, v. 137, p. 111-119, 2016.

CALLISTER, W. D. **Ciência e engenharia de materiais: uma introdução**. 7th. Rio de Janeiro, RJ.: LTC, 2008. 721p.

CAMPOS, D. C. et al. Microencapsulation by spray drying of nitrogen-fixing bacteria associated with lupin nodules. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 2371–2378, 2014.

CANTRELL, K. B. et al. Impact of pyrolysis temperature and manure source on physicochemical characteristics of biochar. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 419–428, Mar 2012.

CARRIER, M. et al. Production of char from vacuum pyrolysis of South-African sugar cane bagasse and its characterization as activated carbon and biochar. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 96, p. 24–32, Jul 2012.

CENDON, F. V. **Modelagem e simulação da liberação de insulina encapsulada em partículas de alginato e whey protein em ambiente gastrointestinal**. 2014. 65p (Dissertação de Mestrado). Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

CHEN, Y. et al. Biomass-based pyrolytic polygeneration system on cotton stalk pyrolysis: Influence of temperature. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 411–418, Mar 2012.

CHEN, Y. et al. Application studies of activated carbon derived from rice husks produced by chemical-thermal process-A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 163, n. 1, p. 39–52, Mar 15 2011.

CHERDCHIM, B.; SATANSAT, J. Influences of ethylene stimulation of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) on the extractives and fungal resistance of lumber. **CERNE**, v. 22, n. 3, p. 223–232, 2016.

CHIA, C. H. et al. Imaging of mineral-enriched biochar by FTIR, Raman and SEM–EDX. **Vibrational Spectroscopy**, v. 62, p. 248–257 2012.

CHITOLINA, J. C. et al. Amostragem de solo para análises de fertilidade, de manejo e de contaminação. In: SILVA, F. C. (Ed.). **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2nd. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. cap. 1.

CHOWDHURY, S. P. et al. Diversity of 16S rRNA and *nifH* genes derived from rhizosphere soil and roots of an endemic drought tolerant grass, *Lasiurus indicus*. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 114–122, 2011.

CHUN, Y. et al. Compositions and sorptive properties of crop residue-derived chars. **Environmental Science & Technology**, v. 38, n. 17, p. 4649-4655, Sep 1 2004.

COVINO, S. et al. Inoculum carrier and contaminant bioavailability affect fungal degradation performances of PAH-contaminated solid matrices from a wood preservation plant. **Chemosphere**, v. 79, p. 855–864, 2010.

CRUZ, J. L. et al. Crescimento e partição de matéria seca e de carbono no mamoeiro em resposta à nutrição nitrogenada. **Bragantia**, v. 63, p. 351-361, 2004.

DA SILVA, M. F. et al. Survival of endophytic bacteria in polymer-based inoculants and efficiency of their application to sugarcane. **Plant Soil**, v. 356, p. 231–243, 2012.

DAI, Z. et al. The potential feasibility for soil improvement, based on the properties of biochars pyrolyzed from different feedstocks. **Journal of Soils and Sediments**, v. 13, n. 6, p. 989-1000, Jun 2013.

DE PAULA, H. C. B. et al. Esferas (Beads) de Alginato como Agente Encapsulante de Óleo de Croton Zehntneri Pax et Hoffm. **Polímeros**, v. 2, p. 112-120, 2010.

DEMIRBAS, A. Effects of temperature and particle size on bio-char yield from pyrolysis of agricultural residues. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 72, n. 2, p. 243-248, Nov 2004.

DEMIRBAS, A. Pyrolysis of ground beech wood in irregular heating rate conditions. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 73, n. 1, p. 39-43, Mar 2005.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003.

DOMINGUES, M. T. et al. Polymeric alginate microspheres containing biochar to immobilize phosphate ions. **Chemical Engineering Transactions**, v. 37, p. 109-114, 2014.

EDREIS, E. M. A.; LUO, G.; YAO, H. Investigations of the structure and thermal kinetic analysis of sugarcane bagasse char during non-isothermal CO₂ gasification. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 107, p. 107-115, 2014.

ERIKSSON, K.-E.; BLANCHETTE, R.; ANDER, P. **Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components**. Berlin: Springer-Verlag, 1990.

FABBRI, D.; TORRI, C.; SPOKAS, K. A. Analytical pyrolysis of synthetic chars derived from biomass with potential agronomic application (biochar). Relationships with impacts on microbial carbon dioxide production. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 93, p. 77–84, 2012.

FARRELL, M. et al. Microbial utilisation of biochar-derived carbon. **Science of the Total Environment**, v. 465, p. 288–297, 2013.

FENICE, M. et al. Application of encapsulated *Penicillium variabile* P16 in solubilization of rock phosphate. **Bioresource Technology**, v. 73, n. 2, p. 157-162, Jun 2000.

FIGUEIREDO, M. V. B. et al. **Biotecnologia aplicada à agricultura - Texto de apoio e protocolos experimentais**. Brasília, DF e Recife, PE Embrapa Informação Tecnológica e Instituto Agrônômico de Pernambuco, 2010. 761.

FIGUEREDO, N. A. et al. Characterization of biochars from different sources and evaluation of release of nutrients and contaminants. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, n. 3, p. 395-403, 2017.

FREDDO, A.; CAI, C.; REID, B. J. Environmental contextualisation of potential toxic elements and polycyclic aromatic hydrocarbons in biochar. **Environmental Pollution**, v. 171, 2012.

GAMALERO, E.; GLICK, B. R. Bacterial Modulation of Plant Ethylene Levels. **Plant Physiology**, v. 169, n. 1, p. 13-22, 2015.

GANGE, A. C. et al. Rapid and recent changes in fungal fruiting patterns. **Science**, v. 316, n. 5821, 2007.

GARCIA, C. et al. KINETICS OF PHOSPHATASE-ACTIVITY IN ORGANIC WASTES. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 25, n. 5, p. 561-565, May 1993.

GARCÍA-DELGADO, C.; ALFARO-BARTA, I.; EYMAR, E. Combination of biochar amendment and mycoremediation for polycyclic aromatic hydrocarbons immobilization and biodegradation in creosote-contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 285, p. 259-266, 2015.

GAUNT, J. L.; LEHMANN, J. Energy balance and emissions associated with biochar sequestration and pyrolysis bioenergy production. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 11, p. 4152-4158, Jun 1 2008.

GEHRING, C.; BENNETT, A. Mycorrhizal fungal-plant-insect interactions: the importance of a community approach. **Environmental Entomology**, v. 38, n. 1, p. 93-102, 2009.

GOVERNMENT, N. **Soil survey standard test methods**. Austrália: Department of Sustainable Natural Resources: 2p. p. 2011.

GRABER, E. R.; ELAD, Y. Biochar impact on plant resistance to disease. In: LADYGINA, N. e RINEAU, F. (Ed.). **Biochar and Soil Biota**. Boca Raton, FL: CRC Press - Taylor and Francis Group, 2013. p.41-68.

GRAY, M. et al. Water uptake in biochars: The roles of porosity and hydrophobicity. **Biomass & Bioenergy**, v. 61, p. 196-205, Feb 2014.

GRILLO, R.; ABHILASH, P. C.; FRACETO, L. F. Nanotechnology Applied to Bio-Encapsulation of Pesticides. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, n. 1, p. 1231-1234, 2016.

GUEDES, A. et al. Raman spectroscopy of coal macerals and fluidized bed char morphotypes. **Fuel**, v. 97, p. 443-449, Jul 2012.

GUERRERO, M. et al. Characterization of 355 Biomass Chars Formed under Different Devolatilization Conditions: Differences 356 between Rice Husk and Eucalyptus. **Energy Fuel**, v. 22, p. 1275–1284, 2008.

GÜSEWELL, S.; GESSNER, M. O. N : P ratios influence litter decomposition and colonization by fungi and bacteria in microcosms. **Functional Ecology**, v. 23, p. 1365-2435, 2009.

HALE, L.; LUTH, M.; CROWLEY, D. Biochar characteristics relate to its utility as an alternative soil inoculum carrier to peat and vermiculite. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 81, 2015.

HANSEN, J. Potatoes and biochar are not friends. <http://dca.au.dk/en/current-news/news/show/artikel/kartofler-og-biochar-er-ikke-gode-venner/>, 2016.

HARDIE, M. et al. Does biochar influence soil physical properties and soil water availability? **Plant Soil**, v. 376, p. 347–361, 2014.

HAREL, Y. M. et al. Biochar mediates systemic response of strawberry to foliar fungal pathogens. **Plant Soil**, v. 357, p. 245-257, 2012.

HEITKAMP, M. A.; CERNIGLIA, C. E. Effects of chemical structure and exposure on the microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in freshwater and estuarine ecosystems. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 1552-8618, 1987.

IJIMA, M. et al. Continuous Application of Biochar Inoculated with Root Nodule Bacteria to Subsoil Enhances Yield of Soybean by the Nodulation Control using Crack Fertilization Technique. **Plant Production Science**, v. 18, p. 197-208, 2015.

JAISWAL, A. J. et al. Rhizoctonia solani suppression and plant growth promotion in cucumber as affect by biochar pyrolysis temperature, feedstock and concentration. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 69, p. 110-118, 2014.

JINDO, K. et al. Physical and chemical characterization of biochars derived from different agricultural residues. **Biogeosciences**, v. 11, p. 6613–6621, 2014.

JOSEPH, S. et al. An investigation into the reactions of biochar in soil. **Australian Journal of Soil Research**, v. 48, p. 501–515, 2010.

JOSEPH, S. et al. Developing a Biochar Classification and Test Methods. In: JOSEPH, J. L. A. S. (Ed.). **Biochar for Environmental Managment - Science and Technology**. London: Earthscan, 2010. p.107-146.

KARUNANAYAKE, A. G. et al. Lead and cadmium remediation using magnetized and nonmagnetized biochar from Douglas fir. **Chemical Engineering Journal**, v. 331, p. 480-491, 2018.

KATYAL, S.; THAMBIMUTHU, K.; VALIX, M. Carbonisation of bagasse in a fixed bed reactor: influence of process variables on char yield and characteristics. **Renewable Energy**, v. 28, n. 5, p. 713-725, Apr 2003.

KAVAMURA, V. N. **Bactérias associadas às cactáceas da Caatinga: promoção de crescimento de plantas sob estresse hídrico**. 2012. 246 (Doutorado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

KEILUWEIT, M. et al. Dynamic Molecular Structure of Plant Biomass-Derived Black Carbon (Biochar). **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 4, p. 1247-1253, Feb 15 2010a.

KIEFT, T. L.; RINGELBERG, D. B.; WHITE, D. C. Changes in Ester-Linked Phospholipid Fatty Acid Profiles of Subsurface Bacteria during Starvation and Desiccation in a Porous Medium. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, p. 3292-3299, 1994.

KIM, P.; HENSLEY, D.; LABBE, N. Nutrient release from switchgrass-derived biochar pellets embedded with fertilizers. **Geoderma**, v. 232, p. 341-351, Nov 2014.

KRISHNA RAO, K. S. V. et al. Controlled release of diclofenac sodium and ibuprofen through beads of sodium alginate and hydroxy ethyl cellulose blends. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 102, n. 6, p. 5708–5718, 2006.

KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; NETO, J. B. F. **Vigor de Sementes: Conceitos e Testes**. Londrina, PR: ABRATES - Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes, 1999. 218.

KUMAR, C. G. et al. Purification and characterization of an extracellular polysaccharide from haloalkalophilic *Bacillus* sp. I-450. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 673-681, 2004.

KÜES, U. Life History and Developmental Processes in the Basidiomycete *Coprinus cinereus*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 2, p. 316–353, 2000.

LAIRD, D. A. The charcoal vision: A win-win-win scenario for simultaneously producing bioenergy, permanently sequestering carbon, while improving soil and water quality. **Agronomy Journal**, v. 100, n. 1, p. 178-181, Jan-Feb 2008.

LAU, A. Y. T. et al. Surface-modified biochar in a bioretention system for *Escherichia coli* removal from stormwater. **Chemosphere**, v. 169, p. 89-98, 2017.

LEHMANN, J.; GAUNT, J.; RONDON, M. Bio-char sequestration in terrestrial ecosystems — A review. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, v. 11, p. 403–427, 2006.

LEHMANN, J.; JOSEPH, S. Biochar for Environmental Management: An introduction. In: JOSEPH, J. L. A. S. (Ed.). **Biochar for Environment Management – Science and Technology**. London, United Kingdom: Earthscan, 2010. cap. 1, p.1-12.

LENG, Y. **Materials characterization - Introduction to microscopic and spectroscopic methods**. Singapore: John Wiley & Sons (Asia), 2008. 337.

LI, X.; HAYASHI, J.-I.; LI, C.-Z. FT-Raman spectroscopic study of the evolution of char structure during the pyrolysis of a Victorian brown coal. **Fuel**, v. 85, n. 12-13, p. 1700-1707, Sep 2006.

LI, X. et al. Functional Groups Determine Biochar Properties (pH and EC) as Studied by Two-Dimensional C-13 NMR Correlation Spectroscopy. **Plos One**, v. 8, n. 6, Jun 19 2013.

LIN, Y. et al. Migration of dissolved organic carbon in biochars and biochar-mineral complexes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 5, p. 677-686, 2012.

LIN, Y. et al.. Water extractable organic carbon in untreated and chemical treated biochars. **Chemosphere**, v. 87, p. 151–157, 2012.

LIU, H. et al. Distribution, utilization structure and potential of biomass resources in rural China: With special references of crop residues. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 12, n. 5, p. 1402-1418, Jun 2008.

LIU, P. et al. Aqueous Leaching of Organic Acids and Dissolved Organic Carbon from Various Biochars Prepared at Different Temperatures. **Journal of Environmental Quality**, v. 44, p. 684–695, 2015.

LUA, A. C.; YANG, T.; GUO, J. Effects of pyrolysis conditions on the properties of activated carbons prepared from pistachio-nut shells. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 72, n. 2, p. 279-287, Nov 2004.

LUPO, B. et al. Characterization of alginate beads with encapsulated cocoa extract to prepare functional food: Comparison of two gelation mechanisms. **Food Hydrocolloids**, v. 49, p. 25-34, Jul 2015.

LYU, H. et al. Effect of pyrolysis temperature on potential toxicity of biochar if applied to the environment. **Environmental Pollution**, v. 218, p. 1-7, 2016.

MACHADO, A. S. et al. Quantificação por DRX dos componentes carbonosos presentes no pó de balão do alto-forno. **Tecnologia em Metalurgia, Materiais e Mineração**, v. 8, n. 4, p. 254-260, 2011.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M. Cultivo do Milho - Germinação e Emergência. **Comunicado Técnico - EMBRAPA Milho e Sorgo**, v. 39, p. 1-9, 2002.

MAJOR, J. **Guidelines on Practical Aspects of Biochar Application to Field Soil in Various Soil Management Systems**. Westerville, OH, USA: International Biochar Initiative 2010.

MAJOR, J. et al. **Biochar - A field guide for gardeners and farmers**: EcoTechnologies: 37 p. 2010.

MAJOR, J. et al. Maize yield and nutrition during 4 years after biochar application to a Colombian savanna oxisol. **Plant and Soil**, v. 333, n. 1-2, p. 117-128, Aug 2010.

MAO, J. D. et al. Abundant and Stable Char Residues in Soils: Implications for Soil Fertility and Carbon Sequestration. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 17, p. 9571-9576, Sep 4 2012.

MASIELLO, C. A. et al. Biochar and microbial signaling: production conditions determine effects on microbial communication. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 20, p. 11496–11503, 2013.

MATSUBARA, Y.; HASEGAWA, N.; FUKUI, H. Incidence of Fusarium Root Rot in Asparagus Seedlings Infected with Arbuscular Mycorrhizal Fungus as Affected by Several Soil Amendments. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v. 71, p. 370-374, 2002.

MCBEATH, A. V. et al. The influence of feedstock and production temperature on biochar carbon chemistry: A solid-state ¹³C NMR study. **Biomass and Bioenergy**, v. 60, p. 121-129, 2014.

MENEZES, C. R.; BARRETO, A. R. Biodegradação de resíduos lignocelulósicos por fungos basidiomicetos: Caracterização dos resíduos e estudo do complexo enzimático fúngico. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 19, n. 2, p. 1365-1391, 2015.

MIKAN, C. J.; ABRAMS, M. D. Altered forest composition and soil properties of historic charcoal hearths in southeastern Pennsylvania. **Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere**, v. 25, n. 5, p. 687-696, May 1995.

MIMMO, T. et al. Effect of pyrolysis temperature on miscanthus (*Miscanthus x giganteus*) biochar physical, chemical and functional properties. **Biomass and Bioenergy**, v. 62, p. 149-157, Mar 2014a. 1873-2909.

MITCHELL, P. J. et al. Shifts in microbial community and water-extractable organic matter composition with biochar amendment in a temperate forest soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 81, p. 244-254, 2015.

MOHAN, D. et al. Organic and inorganic contaminants removal from water with biochar, a renewable, low cost and sustainable adsorbent – A critical review. **Bioresource Technology**, v. 160, p. 191-202, 2014.

MUSUMECI, A. W.; FROST, R. L.; WACLAWIK, E. R. A spectroscopic study of the mineral pectate (calcium acetate). **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 67, n. 3-4, p. 649-661, Jul 2007.

NAKAMURA, Y. et al. Lignin-degrading enzyme production by *Bjerkandera adusta* immobilized on polyurethane foam. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, p. 41-47, 1999.

NETO, D. A. M.; COELHO, R. R. Análise de Sementes da Embrapa Milho e Sorgo. **Serviços de Laboratório de Análise de Sementes**, v. Sete Lagoas, MG, p. 17p, 2010.

NEZHAD, A. S.; GEITMANN, A. The cellular mechanics of an invasive lifestyle. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 15, 2013.

OASMAA, A. et al. Fast pyrolysis of forestry residue. 1. Effect of extractives on phase separation of pyrolysis liquids. **Energy and Fuels**, v. 17, n. 1, p. 1-12, Jan-Feb 2003.

OGAWA, M.; OKIMORI, Y.; TAKAHASHI, F. Carbon sequestration by carbonization of biomass and forestation: three case studies. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, v. 11, n. 2, p. 421-436, 2006.

OLESZCZUK, P. et al. Microbiological, biochemical and ecotoxicological evaluation of soils in the area of biochar production in relation to polycyclic aromatic hydrocarbon content. **Geoderma**, v. 213, p. 502-511, 2014.

PARSHETTI, G. K. et al. TGA-FTIR investigation of co-combustion characteristics of blends of hydrothermally carbonized oil palm biomass (EFB) and coal. **Fuel Processing Technology**, v. 118, p. 228-234, Feb 2014.; 1873-7188.

PHAN, C.-H.; SABARATNAM, V. Potential uses of spent mushroom substrate and its associated lignocellulosic enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 863-873, 2012.

PRESTON, C. M.; SCHMIDT, M. W. I. Black (pyrogenic) carbon: a synthesis of current knowledge and uncertainties with special consideration of boreal regions. **Biogeosciences**, v. 3, n. 4, p. 397-420, 2006.

PUTUN, A. E.; APAYDIN, E.; PUTUN, E. Rice straw as a bio-oil source via pyrolysis and steam pyrolysis. **Energy**, v. 29, n. 12-15, p. 2171-2180, Oct-Dec 2004.

PUTUN, A. E. et al. Comparison between the "slow" and "fast" pyrolysis of tobacco residue. **Industrial Crops and Products**, v. 26, n. 3, p. 307-314, Oct 2007.

RAFIQ, M. K. et al. Influence of Pyrolysis Temperature on Physico-Chemical Properties of Corn Stover (*Zea mays* L.) Biochar and Feasibility for Carbon Capture and Energy Balance. **PLOS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0156894, 2016.

REDDY, B. J.; FROST, R. L.; MARTENS, W. N. Characterization of conicalchalcite by SEM, FTIR, Raman and electronic reflectance spectroscopy. **Mineralogical Magazine**, v. 69, n. 2, p. 155-167, Apr 2005.

REKHA, P. D. et al. Effect of free and encapsulated *Pseudomonas putida* CC-FR2-4 and *Bacillus subtilis* CC-pg104 on plant growth under gnotobiotic conditions. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 2, p. 447-451, Jan 2007.

RIEDEL, T. et al. Changes in the molecular composition of organic matter leached from an agricultural topsoil following addition of biomass-derived black carbon (biochar). **Organic Geochemistry**, v. 69, p. 52-60, 2014.

RITCHIE, S. W.; HANWAY, J. J.; BENSON, G. O. Como a planta de milho se desenvolve. **Arquivo do Agrônomo - Informações Agronômicas**, v. 103, n. 15, p. 120, 2003.

RIVAS, F. et al. Effect of temperature and water activity on mycelia radial growth, conidial production and germination of *Lecanicillium spp.* isolates and their virulence against *Trialeurodes vaporariorum* on tomato plants. **BioControl**, v. 59, p. 99–109, 2004.

RO, K. S.; CANTRELL, K. B.; HUNT, P. G. High-Temperature Pyrolysis of Blended Animal Manures for Producing Renewable Energy and Value-Added Biochar. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 49, n. 20, p. 10125-10131, Oct 20 2010.

ROBERTSON, S. J. et al. Biochar enhances seedling growth and alters root symbioses and properties of sub-boreal forest soils. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 92, n. 2, p. 329-340, Feb 2012.

ROGOVKSA, N. et al. Germination Tests for Assessing Biochar Quality. **Journal of Environmental Quality**, v. 41, n. 4, p. 1014-1022, 2012.

ROJITH, G.; BRIGHT SINGH, I. S. Cellulose Crystallinity Change Assessment of Biochar Produced by Pyrolysis of Coir Pith. **Research Journal of Recent Sciences**, v. 2, p. 1-6, 2013.

SANTOS, F.; TORN, M. S.; BIRD, J. A. Biological degradation of pyrogenic organic matter in temperate forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 51, p. 115-124, 2012.

SAXENA, J.; RANA, G.; PANDEY, M. Impact of addition of biochar along with *Bacillus sp.* on growth and yield of French beans. **Scientia Horticulturae**, v. 162, p. 351–356, 2013.

SCHIMMELPFENNIG, S.; GLASER, B. One Step Forward toward Characterization: Some Important Material Properties to Distinguish Biochars. **Journal of Environmental Quality**, v. 41, p. 1001-1013, 2012.

SCHMIDT, H. P. 55 Uses of Biochar. **Ithaka Journal**, n. Viticulture Ecology Climate-Farming, p. 286-289, 2012.

SEMINARA, A. et al. Osmotic spreading of *Bacillus subtilis* biofilms driven by an extracellular matrix. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, p. 1116-1121, 2012.

SHAABAN, A. et al. Characterization of Biochar Derived from Rubber Wood Sawdust through Slow Pyrolysis on Surface Porosities and Functional Groups. **Procedia Engineering**, v. 68, p. 365-371, 2013.

SHAFIZADEH, F. Introduction to pyrolysis of biomass. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 3, n. 4, p. 283-305, 1982 1982.

SHARMA, R. K. et al. Characterization of chars from pyrolysis of lignin. **Fuel**, v. 83, p. 1469–1482, 2004.

SILVA, F. C. et al. Métodos de análises químicas para avaliação da fertilidade do solo. In: SILVA, F. C. (Ed.). **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2nd. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. cap. 1, parte 2.

SILVA, M. F. et al. Inoculantes formulados com polímeros e bactérias endofíticas para a cultura de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 11, p. 1437-1443, 2009.

SILVERSTEIN, T. P. POLARITY, MISCIBILITY, AND SURFACE-TENSION OF LIQUIDS. **Journal of Chemical Education**, v. 70, n. 3, p. 253-253, Mar 1993.

SMEBYE, A. et al. Biochar amendment to soil changes dissolved organic matter content and composition. **Chemosphere**, v. 142, p. 100-105, 2016.

SMITH, C. R. et al. Molecular Characterization of Inhibiting Biochar Water-Extractable Substances Using Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. **Environmental Science & Technology**, v. 47, p. 13294-13302, 2013.

SMITH, S. E.; SMITH, F. A. Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth. **Mycologia**, v. 104, n. 1, p. 1-13, 2012.

SOUZA, E. C. A. **Uso agronômico do fosfato natural**. 2nd ed. Jaboticabal, SP: Funep, 1997. 47p.

SPOKAS, K. A.; BAKER, J. M.; REICOSKY, D. C. Ethylene: potential key for biochar amendment impacts. **Plant and Soil**, v. 333, n. 1-2, p. 443-452, 2010.

STEVENSON, F. J. **Humus Chemistry - Genesis, composition, reactions**. Characterization of soil organic matter by NMR spectroscopy and analytical pyrolysis. United States of America: Wiley 1994.

TARLEY, C. R. T.; ARRUDA, M. A. Z. Biosorption of heavy metals using rice milling by-products. Characterisation and application for removal of metals from aqueous effluents. **Chemosphere**, v. 54, n. 7, p. 987-995, Feb 2004.

TEIXEIRA, V. F. T. **Estudo da obtenção de biocatalisadores com matrizes de alginato de cálcio visando a produção de biodiesel**. 2011. 69p (Dissertação de Mestrado). Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro.

THIES, J. E.; RILING, M. C. Characteristics of Biochar: Biological Properties. In: JOSEPH, J. L. A. S. (Ed.). **Biochar for Environmental Management - Science and Technology**. Washington: Earthscan, 2010. cap. 6, p.85-105.

TU, J. et al. Alginate microparticles prepared by spray-coagulation method: Preparation, drug loading and release characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 303, p. 171-181, 2005.

TØNNESEN, H. H.; KARLSEN, J. Alginate in drug delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 28, n. 6, p. 621-30, 2002.

UCHIMIYA, M. et al. In situ and ex situ spectroscopic monitoring of biochar's surface functional groups. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 102, p. 53-59, Jul 2013.

UCHIMIYA, M. et al. Sorption of Deisopropylatrazine on Broiler Litter Biochars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 23, p. 12350-12356, Dec 8 2010.

UDEN, P. C. NOMENCLATURE AND TERMINOLOGY FOR ANALYTICAL PYROLYSIS (IUPAC RECOMMENDATIONS 1993). **Pure and Applied Chemistry**, v. 65, n. 11, p. 2405-2409, Nov 1993.

VARTAPETYAN, R. S.; VOLOSHCHUK, A. M. Adsorption mechanism of water molecules on carbon adsorbents. **Uspekhi Khimii**, v. 64, n. 11, p. 1055-1072, 1995 1995.

VEZZANI, F. M.; MIELNICZUK, J. **O solo como sistema**. Curitiba: Ed. dos Autores, 2011. 104.

WARNOCK, D. D. et al. Mycorrhizal responses to biochar in soil - concepts and mechanisms. **Plant and Soil**, v. 300, n. 1-2, p. 9-20, Nov 2007.

WILDMAN, J.; DERBYSHIRE, F. Origins and functions of macroporosity in activated carbons from coal and wood precursors. **Fuel**, v. 70, n. 5, p. 655-661, May 1991.

WRIGHT, S. F.; UPADHYAYA, A. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and soil**, v. 198, p. 97-107, 1998.

YAO, Y. et al. Biochar derived from anaerobically digested sugar beet tailings: Characterization and phosphate removal potential. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 6273-6278, May 2011.

YOUNG, C. C. et al. Encapsulation of Plant Growth-Promoting Bacteria in Alginate Beads Enriched With Humic Acid. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 95, p. 76-83, 2006.

ZHAO, S. X.; TA, N.; WANG, X. D. Effect of Temperature on the Structural and Physicochemical Properties of Biochar with Apple Tree Branches as Feedstock Material. **Energies**, v. 10, p. 1293-1308, 2017.

ZHAO, X. et al. Properties comparison of biochars from corn straw with different pretreatment and sorption behaviour of atrazine. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 338-344, Nov 2013. ISSN 0960-8524; 1873-2976.

ZHENG, W. et al. Sorption properties of greenwaste biochar for two triazine pesticides. **Journal of Hazardous Materials**, v. 181, n. 1-3, p. 121-126, Sep 15 2010.

ZHURINSH, A.; ZANDERSONS, J.; DOBELE, G. Slow pyrolysis studies for utilization of impregnated waste timber materials. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 74, n. 1-2, p. 439-444, Aug 2005.

ZITLALPOPOCA-HERNANDEZA, G. et al. Multitrophic interactions between maize mycorrhizas, the root feeding insect *Phyllophaga vetula* and the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Applied Soil Ecology**, n. 115, p. 38-43, 2017.