



UnB

Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**VALIDAÇÃO ANALÍTICA DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO
ESPECTROFOTOMÉTRICA DE β -GLICOSIDASE E
ARILSULFATASE EM SOLOS**

LARIZZA MARIANNE FROTA FEITOSA

Orientadora

Prof. Dra. Fernanda Vasconcelos de Almeida

Brasília, DF

2026



UnB

Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**VALIDAÇÃO ANALÍTICA DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO
ESPECTROFOTOMÉTRICA DE β -GLICOSIDASE E
ARILSULFATASE EM SOLOS**

LARIZZA MARIANNE FROTA FEITOSA

*Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Química da Universidade
de Brasília como requisito parcial para a
obtenção do Título de Mestre em Química.*

Orientadora

Prof. Dra. Fernanda Vasconcelos de Almeida

Brasília, DF

2026

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, pela saúde e força de vontade para superar os desafios. À minha família, especialmente meu pai e minha mãe, Eduardo e Larissa, expresso minha mais profunda gratidão pelo apoio incondicional ao longo de toda esta trajetória. A confiança, o incentivo constante, a paciência e o afeto de vocês foram fundamentais para que eu superasse os desafios e concluísse esta dissertação. Este trabalho é, também, resultado do amor, da compreensão e da presença de cada um de vocês. Ao meu noivo, deixo registrado meu mais sincero agradecimento pela paciência, pelo apoio constante e pela compreensão ao longo de toda esta trajetória. Seu incentivo, cuidado e presença foram essenciais nos momentos de cansaço e desafios, tornando o caminho mais leve e fortalecendo minha determinação.

À minha orientadora, professora Fernanda Vasconcelos de Almeida, por todos os ensinamentos, por toda paciência, convivência e aprendizado. Aos meus parceiros de trabalho, manifesto meu reconhecimento e gratidão pela compreensão, pelo respeito e pela colaboração, especialmente pela liberação durante as aulas do mestrado e pela tolerância nas tardes em que estive ausente. O apoio profissional, aliado ao espírito de cooperação, foi essencial para que eu pudesse conciliar as responsabilidades laborais e acadêmicas e, assim, alcançar a conclusão desta dissertação. Gostaria de agradecer também a Bianca Perinazzo e a Catarina Martins, pois vários dos resultados contidos nesta dissertação foram realizados em colaboração direta com estas alunas de PIBIC.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo validar e otimizar os métodos espectrofotométricos para a determinação da atividade das enzimas β -glicosidase e arilsulfatase em amostras de solo, com ênfase na comparação entre os métodos de Calibração Externa e Adição de Padrão e na avaliação dos principais parâmetros de validação analítica, como linearidade, sensibilidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão, estabilidade e faixa linear de trabalho. A análise comparativa entre os métodos de padrão externo e Adição de Padrão foi conduzida por meio do confronto entre as curvas de Calibração Externa e de Adição de Padrão para a β -glicosidase. A comparação entre esses dois métodos foi realizada por meio do teste *t* de Student para duas médias independentes (95%) e indicou diferença significativa nos resultados obtidos por eles ($t_{cal} = 7,14 > t_{tab} = 4,303$), sem equivalência estatística, embora com forte correlação entre o conjunto de dados fornecido pelos dois métodos ($r = 0,9989$) e subestimação da quantidade de pNP fornecida pela Calibração Externa. Essa comparação metodológica permitiu inferir que é necessário empregar estratégias de correção, para assegurar maior confiabilidade metrológica nas determinações enzimáticas, quando utilizado o método de Calibração Externa. As curvas em 400 e 420 nm para ambas as enzimas apresentaram $R^2 > 0,990$ atendendo ao critério estabelecido pela RDC nº 166/2017 da Anvisa. O comprimento de 400 nm foi mais sensível (β -glicosidase: LD= 3,83 e LQ= 11,62; Arilsulfatase: LD= 5,42 e LQ= 16,43). Entretanto, o de 420 nm mais adequado para altas concentrações (β -glicosidase: LD= 4,98 e LQ= 15,09; Arilsulfatase: LD= 6,46 e LQ= 19,58). As faixas lineares foram de 5–125 μ g de pNP (β -glicosidase) e 10–125 μ g de pNP (arilsulfatase). Os reagentes pNG, pNS e pNP apresentaram estabilidade excelente durante os 125 dias de verificação. Na secagem do solo, no período de estiagem, houve perda de massa até o 13º dia, reabsorção entre o 15º e o 18º e posterior estabilização; no período chuvoso, perda até o 9º dia, reabsorção entre o 10º e o 15º e estabilização a partir do 17º. Em conjunto, os resultados confirmaram que os métodos validados apresentam robustez, precisão, sensibilidade adequada e conformidade com os critérios regulatórios vigentes, demonstrando viabilidade para aplicação em análises de rotina e em estudos ambientais voltados à avaliação da atividade enzimática em solos.

Palavras-chave: Enzimas, solos, β -glicosidase, arilsulfatase, pNP, LQ e LD

ABSTRACT

This work aimed to validate and optimize spectrophotometric methods for determining the activity of β -glucosidase and arylsulfatase enzymes in soil samples, with emphasis on comparing external calibration and standard addition methods and evaluating the main analytical validation parameters, such as linearity, sensitivity, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), precision, stability, and linear working range. The comparative analysis between the external standard and standard addition methods was conducted by comparing the external calibration and standard addition curves for β -glucosidase. The comparison between these two methods was performed using Student's t-test for two independent means (95%) and indicated a significant difference in the results obtained by them ($t_{cal} = 7.36 > t_{tab} = 4.303$), without statistical equivalence, although with a strong correlation between the data set provided by the two methods ($r = 0.9989$) and underestimation of the amount of pNP provided by the external calibration. This methodological comparison allowed us to infer that it is necessary to employ correction strategies to ensure greater metrological reliability in enzymatic determinations when using the external calibration method. The curves at 400 and 420 nm for both enzymes showed $R^2 > 0.990$, meeting the criterion established by RDC No. 166/2017 of Anvisa. The 400 nm wavelength was more sensitive (β -glucosidase: LOD= 3.83 and LOQ= 11.62; Arylsulfatase: LOD= 5.42 and LOQ= 16.43). However, the 420 nm wavelength was more suitable for high concentrations (β -glucosidase: LOD= 4.98 and LOQ= 15.09; Arylsulfatase: LOD= 6.46 and LOQ= 19.58). The linear ranges were 5–125 μg of pNP (β -glucosidase) and 10–125 μg of pNP (arylsulfatase). The pNG, pNS, and pNP reagents showed excellent stability during the 125 days of verification. During the dry season, there was mass loss until the 13th day, reabsorption between the 15th and 18th days, and subsequent stabilization; during the rainy season, there was loss until the 9th day, reabsorption between the 10th and 15th days, and stabilization from the 17th day onwards. Taken together, the results confirmed that the validated methods are robust, precise, have adequate sensitivity, and comply with current regulatory criteria, demonstrating viability for application in routine analyses and environmental studies focused on evaluating enzymatic activity in soils.

Keywords: *Enzymes, soils, β -glucosidase, arylsulfatase, pNP, LQ and LD.*

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| RESUMO | 3 |
| ABSTRACT | 4 |
| LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS | 7 |
| LISTA DE TABELAS | 8 |
| ÍNDICE DE FIGURAS | 9 |
| 1. INTRODUÇÃO | 10 |
| 2. OBJETIVOS | 13 |
| 2.1. Objetivo Geral | 13 |
| 2.2. Objetivos Específicos | 13 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 13 |
| 3.1. Enzimas no Solo: Indicadores Biológicos | 13 |
| 3.2. BioAS (Bioanálise de Solo) | 15 |
| 3.3. β -Glicosidase e o Estudo das ligações Glicosídicas | 16 |
| 3.4. O Ciclo do Enxofre no Solo e o Papel da Arilsulfatase | 17 |
| 3.5. Evolução dos métodos de análise da β -glicosidase e Arilsulfatase | 19 |
| 3.6. Fatores que afetam a atividade enzimática | 23 |
| 3.7. Validação Analítica | 24 |
| 3.7.1. Seletividade | 26 |
| 3.7.2. Efeito Matriz | 27 |
| 3.7.3. Precisão e Exatidão | 27 |
| 3.7.4. Faixa de Trabalho | 28 |
| 3.7.5. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) | 28 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 29 |
| 4.1. Coleta da Amostra | 29 |
| 4.2. Preparo da Amostra | 29 |
| 4.3. Metodologia para análise da β -glicosidase | 30 |
| 4.3.1. Reagentes e equipamentos utilizados no preparo das curvas de β -glicosidase | 30 |
| 4.3.2. Preparo Curva de Calibração Externa para a β -glicosidase na Validação Analítica | 30 |
| 4.3.3. Análise comparativa de métodos na quantificação de β -glicosidase: Preparo Curva de Calibração Externa | 32 |
| 4.3.4. Análise da β -Glicosidase na amostra utilizada nas curvas de Adição de Padrão | 32 |
| 4.3.5. Análise comparativa de métodos na quantificação de β -glicosidase: Preparo Curvas de Adição de Padrão | 33 |
| 4.4. Metodologia para análise da Arilsulfatase | 34 |
| 4.4.1. Reagentes e equipamentos para o preparo da curva de Arilsulfatase | 34 |
| 4.4.2. Preparo Curva de Calibração Externa para a Arilsulfatase na Validação Analítica | 34 |
| 4.5. Procedimentos Experimentais | 35 |

| | |
|---|-----------|
| 4.5.1. Determinação da linearidade e da faixa de trabalho da β -glicosidase e da Arilsulfatase | 35 |
| 4.5.2. Determinação do LQ e LD para a β -glicosidase e para Arilsulfatase | 36 |
| 4.5.3. Verificação da Estabilidade do pNG, pNS e pNP | 37 |
| 4.5.4. Avaliação da secagem das amostras | 38 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 39 |
| 5.1. Análise comparativa entre os métodos de Calibração Externa e Adição de Padrão | 39 |
| 5.1.1. Curva de calibração com padrões externos para β -glicosidase | 39 |
| 5.1.2. Curva de calibração com Adição de Padrão para β -glicosidase | 41 |
| 5.1.3. Comparação entre os métodos de Calibração Externa e Adição de Padrão | 43 |
| 5.2. Avaliação das Curvas de Calibração, do LQ e LD para a β -glicosidase: Validação Analítica do MCE | 48 |
| 5.3. Avaliação das Curvas de Calibração, do LQ e LD para a Arilsulfatase: Validação Analítica | 50 |
| 5.4. Investigação da Faixa Linear | 53 |
| 5.4.1. Faixa Linear β -Glicosidase | 53 |
| 5.4.2. Faixa Linear Arilsulfatase | 55 |
| 5.5. Avaliação da estabilidade das soluções: pNG, pNS e pNP | 57 |
| 5.6. Avaliação do tempo de secagem das amostras | 59 |
| 5.6.1. Período de Estiagem: Setembro de 2025 | 59 |
| 5.6.2. Período Chuvoso: Outubro de 2025 | 61 |
| 6. CONCLUSÕES | 65 |
| REFERÊNCIAS | 67 |

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

| | |
|--------|---|
| Anvisa | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| AQQUA | Automação, Quimiometria e Química Ambiental |
| ARIL | Arilsulfatase |
| BioAS | Bioanálise de Solo |
| CTC | Capacidade de Troca Catiônica |
| CV | Coeficiente de Variação |
| DOM | Matéria Orgânica Dissolvida |
| FAO | Food and Agriculture Organization |
| GLI | Betaglicosidase |
| INMET | Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia |
| IUBMB | International Union of Biochemistry and Molecular Biology |
| LD | Limite de Detecção |
| LQ | Limite de Quantificação |
| MOS | Matéria Orgânica do Solo |
| MAP | Método de Adição de Padrão |
| MAPMP | Método de Adição de Padrão de Múltiplos Pontos |
| MAPPU | Método de Adição de Padrão de Ponto Único |
| MCE | Método de Calibração Externa |
| MRC | Material de Referência Certificado |
| MUB | Buffer Universal Modificado |
| OR | Osiose Reversa |
| pNP | p-nitrofenol |
| THAM | Tris(hidroximetil)aminometano |
| pNG | p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo |
| pNS | p-nitrofenil sulfato |
| POP | Procedimento Operacional Padrão |
| PHO | Phosphomonoesterase |
| RR | Resposta Relativa |
| RDC | Reunião da Diretoria Colegiada |
| SQR | Substância Química de Referência |
| Unb | Universidade de Brasília |
| UV-Vis | Ultravioleta Visível |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Preparo dos padrões da curva de Calibração Externa da β -glicosidase | 31 |
| Tabela 2: Preparo da curva de Calibração Externa da β -glicosidase para análise comparativa | 32 |
| Tabela 3: Volumes adicionados nas curvas de Adição de Padrão da β -glicosidase | 33 |
| Tabela 4: Preparo dos padrões da curva de Calibração Externa da Arilsulfatase | 35 |
| Tabela 5: Dados para construção da curva de Calibração Externa para a β -glicosidase | 40 |
| Tabela 6: Resultados da análise por Calibração Externa | 41 |
| Tabela 7: Dados para construção das curvas com Adição de Padrão para a β -glicosidase | 42 |
| Tabela 8: Resultados da análise por Adição de Padrão | 43 |
| Tabela 9: Teste t de Student bilateral com 95% de confiança | 45 |
| Tabela 10: Parâmetros analíticos de quantificação para a β -glicosidase | 48 |
| Tabela 11: Parâmetros analíticos de quantificação para a Arilsulfatase | 51 |
| Tabela 12: Dados da avaliação da estabilidade das soluções: pNG, pNS e pNP | 58 |
| Tabela 13: Massas das amostras de solo no período de seca durante 22 dias | 61 |
| Tabela 14: Massas das amostras de solo no período chuvoso durante 22 dias | 64 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Reação envolvendo β -glicosidase hidrolisando o pNG | 16 |
| Figura 2: Formação de ligação glicosídica com configuração α | 17 |
| Figura 3: Éster sulfato de arila sendo hidrolisado por uma arilsulfatase | 19 |
| Figura 4: Hidrólise do pNG catalisado pela β -glicosidase | 20 |
| Figura 5: Estrutura do pNS | 23 |
| Figura 6: Absorbância do pNP | 36 |
| Figura 7: Gráfico da Curva de Calibração Externa para a β -glicosidase | 40 |
| Figura 8: Gráfico curvas Adição de Padrão para a β -glicosidase | 42 |
| Figura 9: Gráfico curvas Adição de Padrão e Calibração Externa para a β -glicosidase | 46 |
| Figura 10: Gráfico curva analítica Adição de Padrão versus Calibração Externa | 47 |
| Figura 11: Gráfico curvas analíticas para a β -glicosidase a 400 e 420 nm | 49 |
| Figura 12: Absorbância dos padrões da curva analítica com massas entre 0,5 a 125 μ g | 49 |
| Figura 13: Gráfico curvas analíticas para a Arilsulfatase a 400 e 420 nm | 51 |
| Figura 14: Espectros de absorção do pNP com destaque (linhas verticais) para os comprimento de onda de 400, 401, 410 e 420 nm | 53 |
| Figura 15: Faixa linear a 400 nm | 55 |
| Figura 16: Faixa linear a 420 nm | 55 |
| Figura 17: Faixa linear a 400 nm | 56 |
| Figura 18: Faixa linear a 420 nm | 57 |
| Figura 19: Gráfico de evolução das absorbâncias dos reagentes | 59 |
| Figura 20: Gráfico de evolução da perda de água no período de estiagem | 61 |
| Figura 21: Gráfico de evolução da perda de água no período chuvoso | 63 |

1. INTRODUÇÃO

As enzimas extracelulares são fundamentais para o ciclo de nutrientes do solo. Suas atividades podem ser alteradas por diferentes práticas de manejo e podem servir como indicadores da qualidade do solo, refletindo a saúde biológica. Diversos autores ressaltam que a atividade enzimática do solo desempenha um papel relevante na biodegradação de poluentes orgânicos tóxicos (Karigar e Rao, 2011; Badzinski *et al.*, 2021), além de contribuir para o controle de doenças em plantas (Baldoni *et al.*, 2020). Estas enzimas dividem-se em dois tipos principais: oxidativas, que ajudam na decomposição de compostos complexos e são influenciadas pelo pH e disponibilidade de nitrogênio e as hidrolíticas, que decompõem carboidratos, proteínas e fósforo, facilitando a liberação de nutrientes essenciais (Sobucki *et al.*, 2021).

A análise da atividade enzimática no solo pode ser uma ferramenta útil para correlacionar com o teor de carbono orgânico, uma vez que está diretamente relacionada à decomposição da matéria orgânica e à liberação de compostos que alimentam a microbiota do solo. Nesse contexto, as enzimas β -glicosidase e arilsulfatase desempenham papéis cruciais na ciclagem de nutrientes essenciais (Tabatabai, 1994). A β -glicosidase está envolvida na degradação de polissacarídeos, como a celulose, liberando açúcares simples que podem ser utilizados por microrganismos do solo. Por outro lado, a arilsulfatase participa da mineralização do enxofre orgânico, convertendo compostos sulfatados em formas disponíveis para as plantas (Minasny *et al.*, 2017; Pawlowski, 2024).

Ambas as enzimas são sensíveis às práticas de manejo do solo e podem servir como indicadores da sua saúde e da eficácia das estratégias de sequestro de carbono. Estudos demonstram que a aplicação de compostos orgânicos pode aumentar significativamente a atividade dessas enzimas, sugerindo uma relação direta entre a gestão da matéria orgânica e a funcionalidade enzimática do solo (Minasny *et al.*, 2017; Pawlowski, 2024). Nesse sentido, a química no solo pode ser vista como a parte que "mostra o que há", isto é, ela se refere à composição do solo, ao conteúdo de carbono orgânico e aos nutrientes presentes. A biologia, por outro lado, "revela o que está vivo", ou seja, refere-se à atividade biológica no solo, particularmente a atuação das enzimas e dos microrganismos que, por meio de suas funções, transformam a matéria orgânica e promovem o ciclo de nutrientes, além de desempenharem um papel fundamental na captura e no sequestro de carbono (Fanin *et al.*, 2022; Uwituze *et al.*, 2022).

Os ensaios enzimáticos que utilizam para-nitrofenol (pNP) são amplamente usados para quantificar atividades enzimáticas no solo. Esses métodos baseiam-se na hidrólise de substratos específicos ligados ao pNP pelas enzimas presentes na amostra, resultando na liberação do para-nitrofenol, cuja concentração reflete a atividade enzimática específica.

Desde sua aplicação inicial em 1969 para medir a atividade da fosfomonoesterase (PHO) em solos (Tabatabai e Bremner, 1969), foram desenvolvidos novos substratos de pNP para quantificar enzimas envolvidas na mineralização de carbono (C), nitrogênio (N), fósforo (P) e enxofre (S). Em 1983, Malcolm destacou que questões metodológicas na aplicação de ensaios enzimáticos a amostras de solo podem afetar a precisão e a comparabilidade dos resultados obtidos como, por exemplo, (1) interferência da matéria orgânica dissolvida (DOM) na espectrofotometria, (2) recuperação incompleta do pNP liberado e (3) concentrações de substrato insuficientes para alcançar a saturação enzimática. Em outro trabalho, Schneider e colaboradores (2000) sugeriram que o método de finalização do ensaio pode impactar a recuperação de pNP, dependendo de cada solo, embora comparações entre diferentes tipos de solo e métodos de finalização ainda sejam limitadas.

A atividade das enzimas β -glicosidase e arilsulfatase no solo é influenciada por diversos fatores que afetam a microbiota e os processos bioquímicos do ambiente edáfico. O teor de matéria orgânica, por exemplo, atua como substrato, de modo que solos com maior conteúdo orgânico tendem a apresentar maior atividade dessas enzimas (Reis *et al.*, 2020). O pH do solo também desempenha um papel fundamental, pois influencia a estabilidade e a conformação das enzimas, além de afetar a disponibilidade de nutrientes essenciais à atividade microbiana (Silva *et al.*, 2019). Outro fator relevante é a capacidade de troca catiônica (CTC), uma vez que solos com maior CTC tendem a reter mais nutrientes, favorecendo o crescimento microbiano e a atividade enzimática (Matos *et al.*, 2021). Além disso, a saturação por bases está positivamente correlacionada com a atividade dessas enzimas, enquanto a saturação por alumínio pode ter efeitos negativos, devido à toxicidade desse elemento para os microrganismos do solo (Souza *et al.*, 2018).

O manejo agrícola também exerce grande influência sobre a atividade enzimática, sendo que práticas como o uso de culturas de cobertura e sistemas de plantio direto contribuem para o aumento da matéria orgânica e da diversidade microbiana, refletindo-se em maior atividade da β -glicosidase e arilsulfatase (Reis *et al.*, 2020). Além disso, o uso de fertilizantes e agrotóxicos

pode modificar a atividade microbiana e, conseqüentemente, a atividade enzimática do solo, sendo que os impactos variam conforme o tipo e a quantidade de insumo aplicado (Pereira *et al.*, 2016). Dessa maneira, torna-se evidente a relevância de um estudo aprofundado sobre as enzimas mencionadas anteriormente, considerando que sua avaliação impacta diretamente a qualidade do solo (Moon e Ok, 2017).

A inclusão do componente biológico no monitoramento da saúde do solo representa um avanço na compreensão da sustentabilidade de agroecossistemas, destacando-se as enzimas beta-glicosidase (GLI) e arilsulfatase (ARIL) como bioindicadores de alta sensibilidade. No entanto, observa-se que a maioria dos trabalhos originais sobre enzimologia do solo, encabeçados por autores como Bremner e Tabatabai (1970) e sintetizados em Tabatabai (1994), não se ocuparam da validação metodológica voltada para o uso em rotinas agrícolas ou da criação de classes de interpretação agrônômica.

Esses estudos clássicos focaram primordialmente na padronização bioquímica das reações e na precisão analítica da medição do p-nitrofenol liberado sob condições controladas, o que manteve essas determinações restritas ao campo da pesquisa acadêmica por décadas devido à dificuldade de interpretar resultados afetados por múltiplos fatores ambientais. A transição da enzimologia de bancada para o suporte à decisão no campo exigiu processos contemporâneos de validação e otimização. Estudos mais recentes, que fundamentaram a tecnologia BioAS, validaram a estabilidade dessas enzimas em amostras de solo secas ao ar e peneiradas (amostra FertBio), permitindo a integração da biologia à logística das análises químicas tradicionais (Mendes, 2021; Margenot *et al.*, 2018). No cenário nacional, a interpretação foi inicialmente validada por meio de calibrações com o rendimento relativo de culturas anuais de grãos, como soja e milho (Mendes *et al.*, 2024; Quaggio; Cantarella, 2022).

Nesse panorama de evolução metodológica, o trabalho de Carneiro *et al.*, (2024), destaca-se como um caso atípico em relação às abordagens predominantes na literatura. Enquanto a maioria dos modelos de interpretação de enzimas encontra barreiras em sistemas de alta diversidade botânica, onde a ausência de dados de rendimento contínuo dificulta a calibração tradicional, este estudo validou uma ferramenta específica para a olericultura tropical. Ao integrar a abordagem CASH da Universidade de Cornell com o modelo de quatro quadrantes (4QM), a pesquisa demonstrou que a ARIL e a GLI possuem robustez para diferenciar sistemas de manejo orgânicos e convencionais independentemente da produtividade das plantas.

Essa abordagem inovadora preencheu uma lacuna científica ao transformar indicadores enzimáticos em ferramentas práticas de diagnóstico para agroecossistemas olerícolas complexos, consolidando a validação interpretativa além do eixo das grandes culturas de grãos. Dessa maneira, o presente trabalho visa contribuir para o preenchimento da lacuna bibliográfica existente no que se refere à validação analítica dos métodos empregados na determinação da atividade das enzimas β -glicosidase e arilsulfatase em solos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Esse trabalho tem como objetivo principal validar analiticamente os métodos de determinação da atividade das enzimas β -glicosidase e arilsulfatase em solos, discutindo as etapas de sua implementação, as limitações metodológicas e a aplicabilidade desses métodos em estudos de qualidade e manejo do solo.

2.2. Objetivos Específicos

- Investigar as interferências da matriz do solo na determinação da atividade das enzimas β -glicosidase e arilsulfatase;
- Avaliar as principais figuras de mérito dos métodos analíticos empregados, tais como limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e faixa de trabalho;
- Validar o método de quantificação enzimática quanto à robustez, sensibilidade e reprodutibilidade;
- Comparar as figuras de mérito obtidas com dados previamente reportados na literatura especializada;
- Avaliar a estabilidade dos reagentes utilizados;
- Avaliar o tempo de secagem de diferentes solos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Enzimas no Solo: Indicadores Biológicos

As enzimas do solo desempenham papel fundamental na manutenção da funcionalidade e da saúde dos ecossistemas edáficos, atuando como biocatalisadores em múltiplos processos

químicos e biológicos. Entre esses processos destacam-se a ciclagem de nutrientes, a decomposição da matéria orgânica, a formação do húmus e a organização estrutural do solo (Mendes *et al.*, 2024; Alovisi, 2023).

Uma de suas funções centrais está associada à participação nos ciclos biogeoquímicos do carbono (C), enxofre (S), fósforo (P) e nitrogênio (N). Por meio da conversão de compostos orgânicos de maior complexidade em formas mais simples e assimiláveis, as enzimas tornam os nutrientes acessíveis às plantas e aos microrganismos do solo (Mendes *et al.*, 2024).

Entre as principais enzimas edáficas, destacam-se a β -glicosidase e a arilsulfatase. A β -glicosidase (EC 3.2.1.21, conforme a nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular – IUBMB) catalisa a etapa final da degradação da celulose, promovendo a hidrólise da celobiose e a liberação de glicose, que constitui uma importante fonte de energia para os microrganismos, estando sua atividade diretamente vinculada ao ciclo do carbono (Mendes *et al.*, 2024). A arilsulfatase (EC 3.1.6.1, segundo a IUBMB), por sua vez, atua na mineralização do enxofre orgânico, apresentando atividade fortemente associada ao conteúdo de matéria orgânica do solo (Alovisi, 2023).

Em função da disponibilidade de nutrientes, os microrganismos do solo produzem e secretam enzimas capazes de intensificar a decomposição de resíduos vegetais, como palhada e lignina, favorecendo os processos de formação e transformação do húmus. Esses mecanismos contribuem diretamente para o acúmulo e a estabilidade da matéria orgânica do solo (MOS), considerada um dos principais indicadores de fertilidade e qualidade edáfica (Mendes *et al.*, 2018; Haneklaus; Bloem; Schnug, 2007).

As enzimas podem ocorrer no solo sob diferentes formas, incluindo enzimas intracelulares, associadas à biomassa microbiana viva; enzimas extracelulares, liberadas ativamente pelos microrganismos ou resultantes da lise celular e enzimas abióticas, que se encontram adsorvidas às partículas minerais do solo ou complexadas a detritos e colóides orgânicos (Klose; Tabatabai, 1999; Nannipieri *et al.*, 1996; Nannipieri; Trasar-Cepeda; Dick, 2018).

As enzimas abióticas correspondem, em grande parte, a enzimas extracelulares originadas da excreção microbiana ou da decomposição de células mortas. Uma fração significativa dessas enzimas permanece cataliticamente ativa por períodos prolongados, devido à sua estabilização por adsorção em superfícies inorgânicas, como argilas e óxidos de ferro, ou por associação com a

matéria orgânica do solo (Nannipieri *et al.*, 1996; Nannipieri; Trasar-Cepeda; Dick, 2018). Em razão dessa persistência, a atividade enzimática tem sido amplamente utilizada como bioindicador da qualidade do solo, permitindo tanto a avaliação da condição atual quanto o resgate da chamada “memória do solo”. Essas atividades funcionam como verdadeiras “impressões digitais” dos sistemas de manejo aos quais o solo foi submetido ao longo do tempo (Mendes *et al.*, 2024).

No contexto brasileiro, as atividades da β -glicosidase e da arilsulfatase constituem a base da tecnologia BioAS (Bioanálise de Solo), a qual integra indicadores biológicos e químicos para a avaliação da saúde do solo em escala ampla e sistematizada (Mendes *et al.*, 2024).

3.2. BioAS (Bioanálise de Solo)

Ao longo de aproximadamente duas décadas, pesquisadores da Embrapa concentraram esforços na identificação de indicadores biológicos confiáveis e responsivos para a avaliação da qualidade dos solos brasileiros. Como resultado desse processo, em julho de 2020 foi lançada a ferramenta BioAS, concebida para incorporar o componente biológico às análises rotineiras de solos, tradicionalmente restritas às dimensões químicas e físicas, representando um avanço significativo na avaliação da saúde do solo agrícola no Brasil (Mendes *et al.*, 2024; Alovisei, 2023).

A BioAS fundamenta-se na determinação da atividade das enzimas arilsulfatase e β -glicosidase, uma vez que essas atividades refletem a capacidade do solo de promover a ciclagem de nutrientes e de responder às práticas de manejo, atuando como bioindicadores altamente sensíveis (Mendes *et al.*, 2024). Nesse ensaio, não se determina a quantidade de enzimas presentes, mas sim o produto gerado pela reação enzimática com o substrato, o pNP, formado sob condições controladas de incubação a 37 °C por uma hora.

A tecnologia BioAS tem como base o estudo clássico de Tabatabai e Bremner (1970), no qual foi proposto um método espectrofotométrico para a determinação da atividade da arilsulfatase por meio da liberação de p-nitrofenol (pNP). Esse trabalho tornou-se um marco nas análises de enzimas do solo, servindo de fundamento para os métodos desenvolvidos posteriormente e permanecendo, até hoje, como referência em análises oficiais, sendo adotado tanto pela Embrapa quanto nos Procedimentos Operacionais Padrão (POP) da FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura).

Dessa maneira, a BioAS destaca-se como uma ferramenta prática, robusta e sensível para a avaliação da saúde do solo, fornecendo informações relevantes sobre seu potencial biológico, sustentabilidade e capacidade de resposta a diferentes sistemas de manejo agrícola com base na atividade enzimática.

3.3. β -Glicosidase e o Estudo das ligações Glicosídicas

As glicosidases, ou glicosídeo-hidrolases, são enzimas hidrolíticas que quebram ligações glicosídicas por adição de água, conforme pode ser observado na Figura 1, liberando monossacarídeos e agliconas (Eivazi; Tabatabai, 1988). Entre elas, a β -glicosidase (EC 3.2.1.21) é especialmente importante, sendo amplamente distribuída em plantas, animais, fungos, bactérias e leveduras e apresentando elevada atividade no solo, superando outras glicosidases (Datta, 2024; Mendes, 2025).

Ela catalisa a hidrólise de ligações β -D-glicosídicas, como as da celobiose, liberando glicose, desempenhando papel crucial na etapa final da degradação da celulose e fornecendo carbono e energia para microrganismos do solo (Gil-Sotres *et al.*, 2005; Passinato *et al.*, 2021). Sua atividade está fortemente relacionada à degradação da matéria orgânica e ao ciclo do carbono, transformando resíduos vegetais em compostos biodisponíveis (Oliveira, 2022; FAO, 2021). Por isso, a β -glicosidase é considerada um bioindicador sensível da saúde do solo e amplamente utilizada em avaliações de qualidade e sustentabilidade de ecossistemas (Passos *et al.*, 2008; Figueiredo *et al.*, 2023; Adetunji *et al.*, 2017).

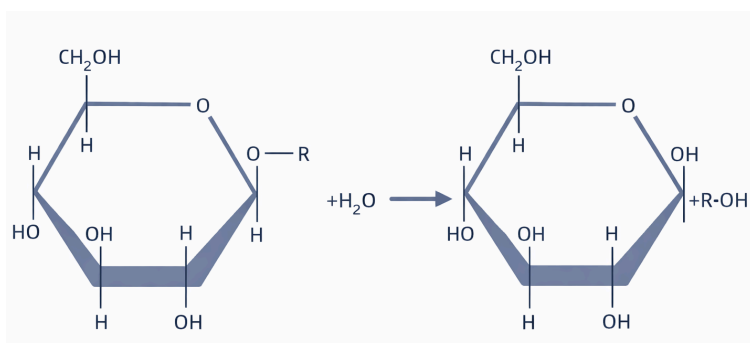


Figura 1- Reação envolvendo β -glicosidase hidrolisando o pNG
Fonte: FAO, 2025.

As ligações glicosídicas são ligações covalentes que unem monossacarídeos, formando oligossacarídeos e polissacarídeos, ou conectam carboidratos a estruturas não-carboidratos

(agliconas), resultando em glicosídeos (Harvey; Ferrier, 2012; Marzzoco; Torres, 2015; Eivazi; Tabatabai, 1988). Essas ligações estabelecem-se entre o carbono anomérico de um açúcar e o grupo hidroxila (-OH) de outro açúcar ou de um álcool, com a liberação de uma molécula de água, conforme apresentado na Figura 2. O processo gera glicosídeos com configuração α ou β , dependendo da orientação do grupo hidroxila no carbono anomérico (Voet; Voet; Pratt, 2015).

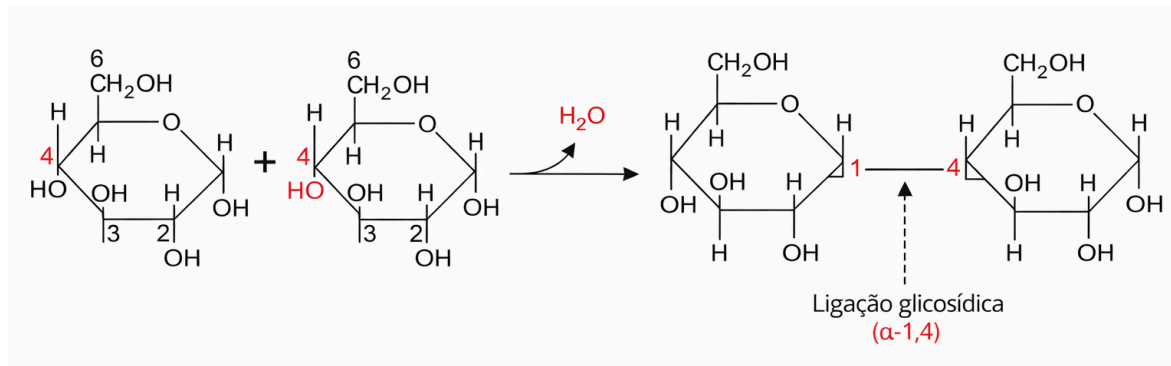


Figura 2 - Formação de ligação glicosídica com configuração α

Fonte: (Marzzoco; Torres, 2015)

Essas ligações são relativamente estáveis e sofrem hidrólise lentamente sob condições fisiológicas, necessitando da ação de enzimas glicosidases para que o processo seja acelerado (Voet; Voet; Pratt, 2015). Dessa forma, quando o carbono anomérico participa de uma ligação glicosídica, ele não consegue alternar livremente entre as formas α e β .

3.4. O Ciclo do Enxofre no Solo e o Papel da Arilsulfatase

O ciclo do enxofre constitui um processo biogeoquímico fundamental, responsável pelas transformações e pelo fluxo do enxofre (S) entre os diferentes compartimentos ambientais (litosfera, pedosfera, biosfera, atmosfera e hidrosfera) bem como pelas interações que ocorrem no interior de cada um desses sistemas (Klose *et al.*, 2011).

Em solos localizados em regiões úmidas e semiúmidas, a fração orgânica corresponde a aproximadamente 90 a 98% do enxofre total. Essa fração pode ser classificada em três grandes grupos: o sulfato orgânico (S-orgânico), que engloba ésteres sulfatos e alguns sulfitos orgânicos; o enxofre ligado ao carbono (C-S), proveniente principalmente de aminoácidos como cisteína e metionina; e o enxofre presente na biomassa microbiana (Smic), que atua simultaneamente como

reservatório e fonte de enxofre, influenciando de maneira direta sua dinâmica no solo (Klose *et al.*, 2011; Scherer, 2001; Germida; Wainwright, 1992; Haneklaus; Bloem; Schnug, 2007).

A fração inorgânica do enxofre, por sua vez, apresenta composição variável em função das características edáficas. Entre suas principais formas destacam-se: o sulfato (SO_4^{2-}), considerado a forma mais comum e estável em solos bem drenados e aerados, além de ser a principal espécie absorvida pelas plantas; o sulfeto (S^{2-}), predominante em ambientes anaeróbios; e o enxofre elementar (S^0), uma forma intermediária frequentemente utilizada como fertilizante, entre outras espécies químicas (Klose *et al.*, 2011; Tabatabai, 2005; Scherer, 2001; Haneklaus; Bloem; Schnug, 2007).

No solo, o enxofre passa continuamente por transformações entre suas formas orgânicas e inorgânicas. Na natureza, a catálise enzimática desempenha papel central em diversos processos bioquímicos essenciais (Pacheco; Mendes, 2021; Alovisei, 2023). Essas reações, no ambiente edáfico, são mediadas por enzimas produzidas por microrganismos, raízes e organismos da fauna do solo. Os principais processos envolvidos nessa ciclagem incluem oxidação, redução, mineralização, imobilização e volatilização (Klose *et al.*, 2011).

Entre essas transformações, a mineralização assume especial relevância, pois promove a conversão do enxofre orgânico em sulfato (SO_4^{2-}), tornando-o disponível para a absorção pelas plantas (Castellano *et al.*, 1990). De acordo com Haneklaus (2007), a mineralização ocorre por dois mecanismos principais: o biológico, no qual microrganismos oxidam compostos orgânicos visando à obtenção de energia, e o bioquímico, caracterizado pela liberação de sulfato por meio da hidrólise enzimática de ésteres sulfatos, catalisada por enzimas do grupo das sulfatases (Klose *et al.*, 2011; Germida; Wainwright; Gupta, 1992; Haneklaus; Bloem; Schnug, 2007). A compreensão das diferentes formas em que o enxofre se apresenta no solo, bem como dos processos responsáveis por suas transformações, é fundamental para o entendimento do funcionamento e dos fatores que influenciam a atividade enzimática da arilsulfatase.

A arilsulfatase desempenha papel fundamental no ciclo do enxofre, sendo responsável pela hidrólise de ésteres sulfato de arila (R-O-SO_3^-), compostos orgânicos nos quais grupos sulfato encontram-se ligados a estruturas aromáticas ou fenólicas. Esses ésteres constituem os substratos naturais da enzima (Mendes, 2025; Klose *et al.*, 2011). No decorrer da reação catalítica, a arilsulfatase promove a clivagem da ligação éster por hidrólise, resultando na formação de três produtos principais: um composto arila livre (R-OH), geralmente um álcool ou

fenol; o ânion sulfato (SO_4^{2-}), que corresponde à forma prontamente assimilável pelas plantas; e um íon hidrogênio (H^+), potencialmente responsável por alterações locais no pH do solo, conforme pode ser observado na Figura 3 (Mendes, 2025; Klose *et al.*, 2011).

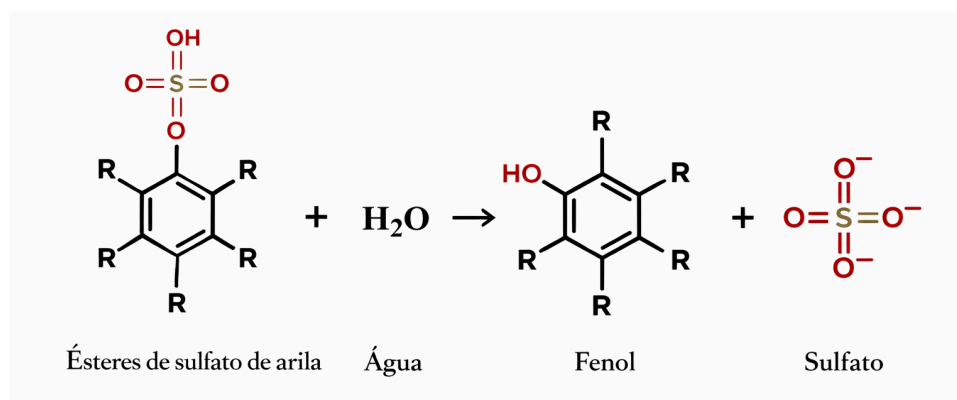


Figura 3 - Éster sulfato de arila sendo hidrolisado por uma arilsulfatase
Fonte: Enzyme Database, 2025.

Em termos de estabilidade térmica, a atividade da arilsulfatase é inativada em temperaturas na faixa de 60 a 70 °C (Klose *et al.*, 2011). Para as arilsulfatases naturais, a temperatura ótima de atuação situa-se entre 20 e 57 °C. Já aquelas obtidas a partir de microrganismos geneticamente modificados apresentam temperatura ótima entre 40 e 45 °C, podendo alcançar até 80 °C no caso de enzimas provenientes de organismos termófilos (Yu *et al.*, 2023). Dessa forma, o conhecimento dos mecanismos catalíticos e das propriedades bioquímicas da arilsulfatase é essencial para a correta compreensão do funcionamento do método analítico e para a adequada interpretação dos resultados obtidos.

3.5. Evolução dos métodos de análise da β -glicosidase e Arilsulfatase

O método de quantificação da atividade da β -glicosidase e Arilsulfatase em solos passou por uma evolução significativa, acompanhando a crescente demanda por indicadores biológicos confiáveis da saúde do solo. Os primeiros estudos sobre essas enzimas remontam à década de 1950, quando Barnett e colaboradores investigaram a atividade da β -glicosidase em 119 linhagens de leveduras, utilizando substratos como esculina, arbutina, salicina e celobiose. A quantificação baseava-se na detecção da aglicona liberada após a hidrólise dos β -glicosídeos, incluindo métodos colorimétricos, e mostrou que o meio de cultivo nem sempre era suficiente para induzir a atividade da enzima (Barnett; Ingram; Swain, 1956).

Um avanço metodológico ocorreu em 1969, com Bremner e Tabatabai, que desenvolveram técnicas colorimétricas padrão para quantificação de enzimas no solo, inicialmente aplicadas a fosfatases. Essa abordagem, baseada na detecção do p-nitrofenol (pNP) liberado durante a hidrólise enzimática, serviu de base para adaptações posteriores envolvendo a β -glicosidase (Bremner; Tabatabai, 1969). Em 1973, Hayano propôs o uso do substrato sintético p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNG) para quantificação direta da β -glicosidase em solos. O método consistia na incubação do solo com pNG, tampão McIlvaine (pH 4,8) e tolueno a 30 °C por 1 hora, seguido de leitura espectrofotométrica a 400 nm. Embora tenha demonstrado boa correlação entre a incubação e a liberação de pNP, não se popularizou (Hayano, 1973).

A consolidação do método ocorreu em 1988 com Eivazi e Tabatabai, que desenvolveram uma técnica simples, precisa e sensível, baseada na incubação do solo com pNG na presença de tolueno, seguida da quantificação do pNP liberado por espectrofotometria entre 400 e 420 nm, após incubação a 37 °C por 1 hora. Essa abordagem representou um avanço importante para estudos de saúde do solo, devido à sua alta sensibilidade e simplicidade operacional (Eivazi; Tabatabai, 1988).

O método de Tabatabai, reconhecido por sua precisão, sensibilidade e simplicidade, foi originalmente desenvolvido para fosfatases e posteriormente adaptado para a β -glicosidase, arilsulfatase e outras hidrolases (Evangelista *et al.*, 2012; Tabatabai, 1994). A técnica baseia-se na quantificação colorimétrica do p-nitrofenol (pNP), liberado durante a hidrólise do substrato sintético incolor p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNG), catalisado pela β -glicosidase, conforme ilustrado na Figura 4 (Mól *et al.*, 2023).

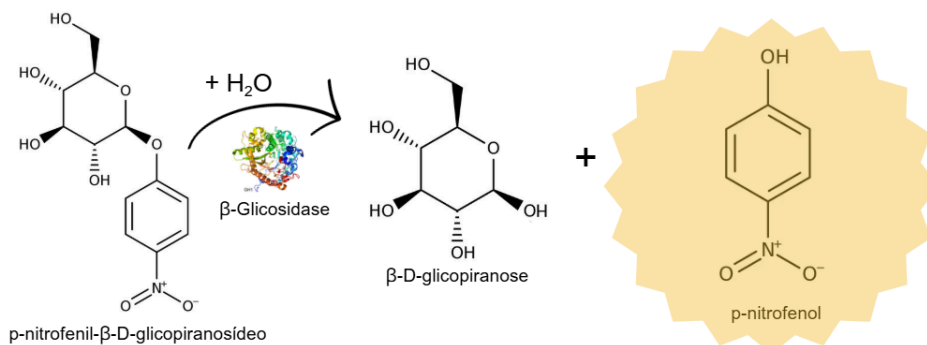


Figura 4 - Hidrólise do pNG catalisado pela β -glicosidase

Fonte: Perinazzo, Bianca, 2025.

O método original para quantificação da β -glicosidase no solo envolve a peneiração de 1 g de solo (<2 mm), seguida da adição de solução de p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNG), tolueno e tampão universal modificado (MUB, pH 6,0), com incubação por 1 h a 37 °C (Tabatabai, 1994; Evangelista *et al.*, 2012). A reação é interrompida com CaCl₂ 0,5 M e tampão THAM pH 12,0, que previnem hidrólise química do pNG e estabilizam a suspensão, evitando dispersão de partículas e extração indesejada de matéria orgânica (Tabatabai, 1994; Deng; Popova, 2011). Após filtração, o p-nitrofenol liberado é quantificado por espectrofotometria UV-Vis (400–420 nm), utilizando controles branco e curva analítica preparada com padrões de pNP em concentrações conhecidas (0–5 μ g/mL) para garantir a confiabilidade dos resultados (Tabatabai, 1994; Deng; Popova, 2011).

Posteriormente, diversas adaptações surgiram para otimizar e simplificar o ensaio. Inicialmente, o tolueno era utilizado como agente antisséptico para impedir o crescimento microbiano e a assimilação dos produtos da reação (Klose; Tabatabai, 2002). Estudos posteriores demonstraram que o uso do tolueno poderia ser dispensado em incubações curtas (< 2 horas) sem afetar a atividade detectada, inclusive em solos tropicais (Bandick; Dick, 1999; Verchot; Borelli, 2005; Lisboa *et al.*, 2012).

Em continuidade a esses avanços, a Embrapa implementou a β -glicosidase e a arilsulfatase como bioindicadores da qualidade do solo por meio da tecnologia Bioanálise de Solo (BioAS), lançada em 2020. Esse método, baseado no protocolo de Tabatabai (1994), foi simplificado pela exclusão do tolueno, tornando-o mais acessível para análises de rotina. Uma inovação da BioAS foi a adaptação para amostras secas ao ar, coletadas no período pós-colheita, integrando procedimentos de coleta, preparo e análise química e biológica dentro do conceito FERTBIO. Além disso, foram desenvolvidas tabelas interpretativas específicas para Latossolos Vermelhos argilosos do Cerrado, classificando a atividade enzimática em categorias como baixa, moderada e adequada, considerando parâmetros agronômicos e de matéria orgânica (Mendes; Junior; Lopes, 2018; Mendes *et al.*, 2020; 2024).

Em 2021, a Embrapa publicou um guia técnico detalhando o comportamento da β -glicosidase frente a variáveis como temperatura, pH, inibidores e íons metálicos, contribuindo para a validação e refinamento do método (Pacheco; Mendes, 2021). Estudos também demonstraram que é possível reduzir a quantidade de solo e de soluções utilizadas no ensaio sem comprometer os resultados, diminuindo insumos e resíduos (Acosta-Martinez *et al.*, 2021).

Para a Arilsulfatase, o marco inicial para o estudo desta enzima também remete ao método espectrofotométrico proposto por Tabatabai e Bremner (1970). Esta metodologia baseia-se na incubação de amostras de solo com uma solução tamponada de p-nitrofenil sulfato de potássio (pNS) em pH 5,8. Durante o período de incubação, geralmente fixado em uma hora a 37 °C, a arilsulfatase catalisa a clivagem do substrato, liberando o composto fenólico p-nitrofenol (pNP). A reação é interrompida pela adição de cloreto de cálcio (CaCl₂) e a coloração amarela característica do pNP é desenvolvida mediante a alcalinização do meio com hidróxido de sódio (NaOH).

A intensidade cromática é então quantificada via espectrofotometria em comprimentos de onda entre 400 e 420 nm. Apesar de sua robustez, este método enfrenta desafios em solos com elevados teores de matéria orgânica, onde a co-extração de substâncias húmicas pode gerar leituras falso-positivas, exigindo protocolos rigorosos de correção com brancos de solo (Tabatabai; Bremner, 1970). De forma análoga ao método empregado para a β-glicosidase, a hidrólise catalisada pela arilsulfatase promove a liberação de p-nitrofenol (pNP), conforme ilustrado na Equação 1.



A estrutura apresentada na Figura 5 corresponde ao p-nitrofenil sulfato, um éster sulfato aromático amplamente empregado como substrato sintético em ensaios de atividade da arilsulfatase em solos, formado a partir da esterificação do grupo hidroxila fenólico do p-nitrofenol por um agente surfactante, resultando na ligação covalente do grupo sulfato (–O–SO₃H) ao anel aromático. O enxofre permanece em elevado estado de oxidação, coordenado a quatro átomos de oxigênio, enquanto o grupo nitro, em posição para, atua como substituinte fortemente eletronegativo, contribuindo para a estabilidade da molécula e para a eficiência da clivagem enzimática da ligação S–O. Durante a ação da arilsulfatase, ocorre a hidrólise desse éster, com liberação de p-nitrofenol, cuja quantificação espectrofotométrica permite a determinação indireta da atividade enzimática, tornando esse substrato adequado para aplicações analíticas em estudos de solos (FAO, 2025).

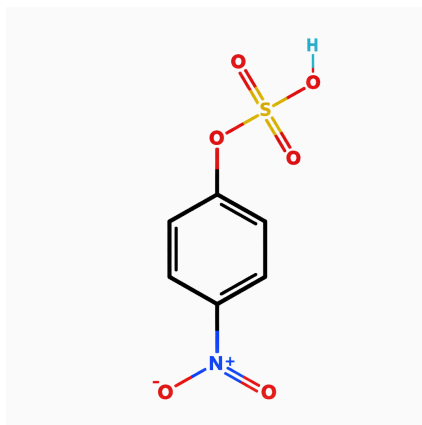


Figura 5 - Estrutura do pNS
Fonte: (FAO, 2025).

Atualmente, a fronteira do conhecimento na análise da arilsulfatase transcende a atividade catalítica e integra ferramentas da biologia molecular. A quantificação da expressão dos genes *atsA*, responsáveis pela síntese da enzima, permite diferenciar entre a atividade enzimática potencial e a atividade real no solo. Essa abordagem integrada, que combina a bioquímica clássica com técnicas de sequenciamento de nova geração, permite uma compreensão holística de como fatores de manejo influenciam não apenas a função, mas a estrutura das comunidades microbianas responsáveis pela mineralização do enxofre (Yu *et al.*, 2023).

Mais recentemente, em 2025, a FAO publicou um Procedimento Operacional Padrão (POP) que descreve o procedimento adotado para a análise da atividade enzimática em solos, baseado nos métodos de Tabatabai, Dick e Acosta-Martínez, reconhecendo globalmente essas duas enzimas como um bioindicadores-chave para monitoramento ambiental e agrícola (FAO, 2025; Mendes, 2025).

3.6. Fatores que afetam a atividade enzimática

A atividade enzimática depende de fatores ambientais, físicos, químicos e de manejo, apresentando intervalos ideais para cada variável. A β -glicosidase e a arilsulfatase no solo possuem pH ótimo entre 5,0 e 6,8, com maior estabilidade em pH 6,0; desvios dessa faixa reduzem suas atividades, tornando-as bioindicadores sensíveis a alterações ambientais, como a acidificação do solo (Tabatabai, 1994; Esen, 2003; Silveira *et al.*, 2022; Adetunji *et al.*, 2017).

A umidade também regula a atividade enzimática, sendo significativamente reduzida em condições de seca, comprometendo a decomposição da matéria orgânica e a liberação de

nutrientes. A disponibilidade de substrato, principalmente carboidratos oriundos da matéria orgânica, promove aumento da velocidade da reação até a saturação enzimática, enquanto práticas de manejo que elevam o aporte de resíduos orgânicos favorecem a atividade da β -glicosidase (Harvey; Ferrier, 2012; Mendes *et al.*, 2024).

A temperatura influencia a cinética enzimática, aumentando a velocidade das reações até o ponto em que ocorre desnaturação térmica, geralmente acima de 50–55 °C (Harvey; Ferrier, 2012; Marzzoco; Torres, 2015). O tempo de meia-vida das β -glicosidases e arilsulfatases varia conforme a temperatura, pH e origem, podendo oscilar de minutos a dezenas de dias (Erkanli, 2024; Ahmed *et al.*, 2017).

A profundidade do solo também impacta a atividade enzimática, sendo mais elevada nas camadas superficiais, devido à maior biomassa microbiana e disponibilidade de carbono orgânico, e diminuindo progressivamente em profundidade (Adetunji *et al.*, 2017). Aspectos metodológicos, como a coleta e o preparo das amostras, podem influenciar os resultados, embora essas enzimas apresentem relativa estabilidade em amostras secas (Eivazi; Tabatabai, 1990; Tabatabai, 1994; Silveira *et al.*, 2022).

3.7. Validação Analítica

Com fundamento na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166, publicada em 2017 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), a validação analítica consiste em um procedimento sistemático de avaliação de métodos por meio de ensaios experimentais. Esse processo tem por finalidade gerar evidências científicas objetivas que comprovem que um método atende de forma satisfatória aos requisitos específicos estabelecidos para o uso ao qual se destina (Brasil, 2017). A validação constitui uma etapa indispensável tanto no desenvolvimento quanto na aplicação de ensaios laboratoriais, pois garante a obtenção de resultados exatos, reprodutíveis e confiáveis (Marsona *et al.*, 2020; Ribani *et al.*, 2004). Assim, a validação visa demonstrar a adequação do método analítico à sua finalidade, assegurando a consistência e a credibilidade dos dados produzidos (Brasil, 2017; Marsona *et al.*, 2020; Ribani *et al.*, 2004).

A adoção de métodos analíticos não validados pode comprometer substancialmente a confiabilidade dos resultados, conduzindo a interpretações incorretas e à tomada de decisões técnicas inadequadas, com potenciais impactos econômicos negativos. No âmbito da quantificação da atividade enzimática, dados inconsistentes podem resultar na implementação de

práticas de manejo do solo indevidas ou antecipadas, afetando a eficiência produtiva. Ademais, tais limitações dificultam a comprovação da eficácia de técnicas agronômicas, reduzindo a confiabilidade de estudos subsequentes e prejudicando o planejamento de intervenções futuras (Ribani *et al.*, 2004).

Os processos de validação de métodos analíticos podem ser classificados em diferentes modalidades, destacando-se a validação laboratorial e a validação completa. A validação laboratorial, também denominada validação interna ou *in house validation*, é conduzida em um único laboratório e tem como objetivo avaliar métodos em fase de desenvolvimento ou verificar a aplicabilidade de métodos já consolidados. Essa etapa é considerada preliminar à validação completa e requer, no mínimo, a avaliação dos parâmetros de precisão, exatidão e seletividade (Brasil, 2017; Ribani *et al.*, 2004). Por sua vez, a validação completa compreende a análise abrangente das características de desempenho do método, incluindo estudos interlaboratoriais destinados a verificar sua reprodutibilidade em diferentes condições analíticas. Essa abordagem possibilita a estimativa da incerteza expandida associada ao método, requisito essencial para sua oficialização (Ribani *et al.*, 2004).

A condução adequada da validação analítica é orientada por diretrizes técnicas e normativas estabelecidas por agências reguladoras, que servem como referência para a indústria, laboratórios de controle de qualidade e órgãos fiscalizadores. No contexto brasileiro, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMET) são os principais responsáveis pela definição desses critérios (Brasil, 2017; Ribani *et al.*, 2004).

Neste estudo, adotou-se a RDC nº 166/2017 da Anvisa como referência normativa, uma vez que essa resolução estabelece os requisitos e recomendações para a validação de métodos analíticos aplicáveis a insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos biológicos. De acordo com essa norma, os parâmetros de validação e seus respectivos critérios de aceitação devem ser definidos considerando as características do analito e a natureza do método analítico empregado. Entre os principais parâmetros recomendados destacam-se a seletividade, a linearidade, a faixa de aplicação, o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) (Brasil, 2017; Ribani *et al.*, 2004).

3.7.1. Seletividade

De acordo com a RDC nº 166/2017, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) define a seletividade como a capacidade de um método analítico em identificar ou quantificar a resposta atribuída exclusivamente ao analito de interesse, sem a influência de componentes potencialmente presentes na amostra, tais como o diluente, impurezas ou produtos de degradação (Brasil, 2017). Dessa forma, a avaliação da seletividade constitui a etapa inicial do processo de validação, uma vez que a ausência desse atributo compromete diretamente a confiabilidade dos demais parâmetros de desempenho do método, incluindo a linearidade (Ribani *et al.*, 2004). Para métodos analíticos não cromatográficos, a RDC nº 166/2017 dispensa a comprovação da ausência de interferência proveniente de produtos de degradação formados em decorrência de variações de pH, temperatura, processos oxidativos ou exposição à luz (Brasil, 2017).

A seletividade do método em estudo é garantida pela utilização do p-nitrofenol como substância de referência, uma vez que se trata de um composto sintético (Buan *et al.*, 2021) que não ocorre naturalmente em solos, minimizando possíveis interferências provenientes do diluente ou da matriz amostral (Mendes, 2025).

No procedimento analítico para a análise da β -glicosidase, o substrato sintético p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNG) é adicionado às amostras de solo antes do período de incubação. A enzima β -glicosidase presente no solo catalisa a clivagem da ligação glicosídica entre o p-nitrofenol e a β -D-glicopiranosose, resultando na liberação de p-nitrofenol (Eivazi *et al.*, 1988). Em meio alcalino, esse composto desenvolve coloração amarela (Buan *et al.*, 2021), permitindo sua quantificação por espectrofotometria UV-Vis. Em contrapartida, a β -D-glicopiranosose, por se tratar de um açúcar, não apresenta resposta analítica no método empregado, assegurando que a quantificação seja restrita exclusivamente ao p-nitrofenol (Tabatabai, 1994; Deng; Popova, 2011).

Já com a arilsulfatase, após a ação dessa enzima sobre o substrato p-nitrofenil-sulfato (pNS), o pNP é liberado em meio alcalino e adquire coloração amarela intensa e estável, devido à sua desprotonação (Mendes, 2025; Tabatabai; Bremner, 1970). Assim, uma amostra de solo sem adição do substrato não apresenta absorvância significativa no comprimento de onda de leitura, o que comprova que a matriz pura não interfere no sinal analítico.

3.7.2. Efeito Matriz

O efeito matriz corresponde à interferência exercida pelos constituintes da amostra sobre a resposta analítica de um determinado analito (Brasil, 2017). De modo geral, esse fenômeno se manifesta quando compostos presentes na matriz, distintos da substância de interesse, alteram a resposta instrumental do analito, resultando em um erro de natureza proporcional (Marsona *et al.*, 2020).

Em métodos analíticos aplicados a matrizes complexas, como o solo, a avaliação do efeito matriz torna-se uma etapa indispensável. De acordo com a RDC nº 166/2017, essa verificação deve ser realizada por meio da comparação dos coeficientes angulares de curvas analíticas obtidas a partir da substância química de referência (SQR) preparada em solvente e da mesma SQR adicionada a uma amostra real, caracterizando uma amostra fortificada. As duas curvas devem ser construídas utilizando o mesmo número de pontos, no mínimo cinco níveis de concentração distintos, e analisadas em réplicas, obedecendo aos mesmos critérios estabelecidos para o estudo de linearidade. A inexistência de interferência da matriz é confirmada quando não há diferença estatisticamente significativa entre as inclinações das curvas, indicando paralelismo, sendo necessária a aplicação de um teste de hipótese com nível de significância de 5% (Brasil, 2017).

Em trabalho recente, publicado em 2025 no periódico *Pedobiologia (Journal of Soil Ecology)*, Silva e colaboradores realizaram a comparação entre os métodos de Calibração Externa e Adição de Padrão com o objetivo de avaliar o efeito matriz. Os resultados evidenciaram que, mesmo na presença da matriz solo, a resposta analítica é atribuída exclusivamente ao p-nitrofenol (pNP), observando-se apenas variações na intensidade do sinal analítico. Entretanto, tais variações não comprometem as tendências relativas da atividade enzimática, indicando que os dados obtidos permanecem consistentes na comparação entre diferentes tipos de solo (Silva; Kaschuk, 2025).

3.7.3. Precisão e Exatidão

A precisão refere-se ao grau de concordância entre resultados obtidos a partir de medições repetidas de uma mesma amostra homogênea, realizadas sob condições previamente estabelecidas. Conforme disposto na RDC nº 166/2017, a avaliação da precisão é realizada por meio da análise da dispersão dos resultados, expressa pelo cálculo do coeficiente de variação

(CV), utilizando amostras preparadas de forma independente e analisadas sob condições operacionais idênticas (Brasil, 2017).

A exatidão, por sua vez, expressa o grau de concordância entre o valor obtido experimentalmente e o valor verdadeiro ou de referência (Miller; Miller, 2010). Para essa avaliação, a utilização de materiais de referência certificados (MRC) é considerada essencial, uma vez que esses materiais apresentam concentrações conhecidas com elevado nível de confiabilidade, rastreáveis a padrões metrológicos internacionalmente reconhecidos, além de fornecerem informações sobre a incerteza associada aos valores certificados.

No entanto, nesse estudo, a exatidão não foi determinada em razão da indisponibilidade de amostras certificadas compatíveis com a matriz e os analitos investigados. Essa restrição inviabilizou a estimativa do viés em relação a um valor verdadeiro, limitando a avaliação da qualidade analítica à análise da precisão e a outros mecanismos de controle interno adotados no laboratório.

3.7.4. Faixa de Trabalho

A faixa de trabalho de um método analítico refere-se ao intervalo de concentrações no qual os resultados obtidos apresentam confiabilidade comprovada, sustentada pelos parâmetros de linearidade, precisão e exatidão previamente avaliados. Conforme estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária na RDC nº 166/2017, a definição dessa faixa deve levar em consideração o objetivo específico do método analítico. Para métodos destinados à determinação de teor, recomenda-se que a faixa de trabalho englobe concentrações situadas entre 80% e 120% do valor nominal do analito (Brasil, 2017).

3.7.5. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser detectada por um método analítico, ainda que não seja necessariamente quantificada com exatidão, enquanto o limite de quantificação (LQ) refere-se à menor concentração que pode ser determinada com níveis aceitáveis de precisão e exatidão, nas condições estabelecidas para o ensaio.

De acordo com a RDC nº 166/2017, o LD pode ser estimado por diferentes abordagens, incluindo a observação visual, a razão sinal-ruído ou o uso de parâmetros estatísticos obtidos a

partir da curva analítica; em métodos visuais, o LD é definido como a menor concentração capaz de gerar uma resposta perceptível, ao passo que, em métodos instrumentais, pode ser determinado por uma razão sinal-ruído mínima de 3:1. O LQ, por sua vez, pode ser calculado de forma análoga ou estimado pela razão sinal-ruído, sendo recomendada, nesse caso, uma relação mínima de 10:1.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta da Amostra

A metodologia aqui descrita foi realizada no laboratório AQQUA (Grupo de Automação, Quimiometria e Química Ambiental), localizado no Instituto de Química da Universidade de Brasília. A amostra para a análise comparativa entre os métodos de Calibração Externa e Adição de Padrão foi coletada no jardim do Instituto de Química da UnB. A escolha do local de coleta fundamentou-se na viabilidade operacional do estudo, considerando-se a maior facilidade de acesso e execução das atividades de amostragem, o que permitiu a realização adequada dos procedimentos experimentais previstos.

Antes de realizar a coleta de solo, foram removidos a vegetação e outros elementos presentes na superfície, como galhos e pedras, cuidadosamente, para não retirar a camada superficial do solo nem remover a matéria orgânica. Em seguida, utilizando uma pá, o solo foi coletado na profundidade de 0 a 10 mm. A amostra foi coletada de forma individual e transferida para uma sacola plástica, com a devida identificação, incluindo informações como data, local da coleta e da amostra.

4.2. Preparo da Amostra

No laboratório, o solo foi peneirado utilizando uma peneira com malha de 4 mm, a fim de remover partículas maiores e garantir a uniformidade da amostra. Em seguida, materiais orgânicos grosseiros, como raízes e tecidos de plantas, foram retirados manualmente com o auxílio de uma pinça, para evitar interferências nos resultados da análise. O solo peneirado foi colocado em uma placa de Petri (plástico ou vidro), previamente coberta com papel alumínio, formando uma tampa. Pequenos furos foram feitos no papel alumínio para permitir a circulação de ar e evitar o acúmulo de umidade.

A placa de Petri com o solo foi pesada, e o valor obtido foi registrado para controle. Em seguida, a amostra foi deixada para secar à temperatura ambiente por 7 dias, em local arejado e afastado de ambientes fechados ou úmidos, disposta em suporte sobre a bancada destinada às análises enzimáticas, no laboratório AQQUA, garantindo a eliminação adequada da umidade do solo antes de prosseguir com as etapas subsequentes. Posteriormente, para a realização das análises deste estudo, as amostras secas foram pesadas em triplicata ($1,00 \text{ g} \pm 0,05 \text{ g}$).

4.3. Metodologia para análise da β -glicosidase

4.3.1. Reagentes e equipamentos utilizados no preparo das curvas de β -glicosidase

Os materiais e reagentes utilizados no experimento incluíram os seguintes reagentes: reagente 4-nitrofenol (Sigma, código 1048-5G), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich), tampão THAM (Sigma-Aldrich). Os equipamentos e utensílios empregados incluíram erlenmeyers de 50 mL, rolhas de borracha, estufa, funis de vidro, papel de filtro qualitativo e balança analítica com precisão de quatro casas decimais (Shimadzu ATX24R). As medidas de absorvância também foram realizadas no UV-Vis Agilent Modelo Cary 8454, com o software ChemStation.

4.3.2. Preparo Curva de Calibração Externa para a β -glicosidase na Validação Analítica

Inicialmente, foi preparada a solução estoque de p-nitrofenol na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Para isso, pesou-se com precisão 0,5010 g de p-nitrofenol (Sigma 104-8) utilizando uma balança analítica de quatro casas decimais. O reagente foi dissolvido em aproximadamente 400 mL de água de osmose reversa dentro de um béquer de 500 mL, utilizando agitação magnética até a completa solubilização do sólido. Em seguida, a solução foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 500 mL e o volume foi ajustado até a marca com água de osmose reversa. A solução final foi armazenada em frasco âmbar e mantida sob refrigeração para garantir sua estabilidade.

A partir dessa solução-mãe, foram preparadas três soluções independentes para a construção das curvas de calibração na concentração de 25,0 $\mu\text{g/mL}$. Para isso, pipetou-se 2,5 mL da solução estoque em um balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com água de OR. Dessa forma, obteve-se uma solução diluída com concentração final de 25,0 $\mu\text{g/mL}$.

A montagem da curva foi realizada em triplicata, conforme os volumes e concentrações indicados na Tabela 1. A sequência de adição dos reagentes seguiu a seguinte ordem: água de OR, solução padrão de pNP (25,0 µg/mL), solução de CaCl₂ 0,5 M e, por fim, solução tampão THAM ajustada para pH 12.

Tabela 1: Preparo dos padrões da curva de Calibração Externa da β-glicosidase

| Ponto | pNP (µg) | Água de OR (mL) | pNP 25,0 µg/mL (mL) | CaCl ₂ 0,5 M (mL) | THAM pH 12 (mL) |
|--------|-------------|--------------------|------------------------|---------------------------------|--------------------|
| Branco | 0 | 5,00 | 0,00 | 1,00 | 4,00 |
| 1 | 0,5 | 4,98 | 0,02 | 1,00 | 4,00 |
| 2 | 1,0 | 4,96 | 0,04 | 1,00 | 4,00 |
| 3 | 5,0 | 4,80 | 0,20 | 1,00 | 4,00 |
| 4 | 10,0 | 4,60 | 0,40 | 1,00 | 4,00 |
| 5 | 15,0 | 4,40 | 0,60 | 1,00 | 4,00 |
| 6 | 20,0 | 4,20 | 0,80 | 1,00 | 4,00 |
| 7 | 22,5 | 4,10 | 0,90 | 1,00 | 4,00 |
| 8 | 25,0 | 4,00 | 1,00 | 1,00 | 4,00 |
| 9 | 30,0 | 3,80 | 1,20 | 1,00 | 4,00 |
| 10 | 40,0 | 3,40 | 1,60 | 1,00 | 4,00 |
| 11 | 50,0 | 3,00 | 2,00 | 1,00 | 4,00 |
| 12 | 75,0 | 2,00 | 3,00 | 1,00 | 4,00 |
| 13 | 100,0 | 1,00 | 4,00 | 1,00 | 4,00 |
| 14 | 125,0 | 0,00 | 5,00 | 1,00 | 4,00 |

Para interpretar corretamente os resultados da análise enzimática, é essencial compreender a conversão entre a massa de solo utilizada e o volume da solução extratora. Quando 1 g de solo é extraído com 10 mL de solução, toda a massa de p-nitrofenol (pNP) liberada está diluída neste volume. Assim, ao determinar a concentração de pNP na solução (em µg/mL), deve-se aplicar um fator de correção para expressar o resultado em termos de massa por grama de solo (µg/g). Esse fator pode ser aplicado de duas maneiras: após a interpolação na curva-padrão, multiplicando a concentração obtida por 10; ou previamente, ajustando a curva-padrão para representar diretamente a massa de pNP, eliminando a necessidade de correção posterior.

Cada ponto da curva analítica foi elaborado em triplicata autênticas, ou seja, para cada concentração foram preparadas três soluções distintas, identificadas como Replicatas A, B e C e lidas 3 vezes no equipamento (replicatas analíticas). As medições foram realizadas de forma sequencial, iniciando pela menor concentração.

4.3.3. Análise comparativa de métodos na quantificação de β -glicosidase: Preparo Curva de Calibração Externa

A curva de Calibração Externa foi construída conforme Eivazi e Tabatabai (1988), a partir da preparação de seis soluções-padrão em béqueres de 50 mL, contendo THAM, CaCl_2 , p-nitrofenol e água de OR, conforme proporções listadas na Tabela 2. Essa curva foi utilizada para interpolação dos valores de absorbância das amostras e determinação da atividade enzimática.

Tabela 2 – Preparo da curva de Calibração Externa da β -glicosidase para análise comparativa

| pNP (μg) | pNP ($\mu\text{g/mL}$) | Água de OR (mL) | pNP 100,0 $\mu\text{g/mL}$ (mL) | CaCl_2 0,5 M (mL) | THAM pH 12 |
|--------------------------|-----------------------------|--------------------|------------------------------------|-------------------------------|---------------|
| 0 | 0 | 5 | 0 | 1 | 4 |
| 10 | 1 | 4 | 1 | 1 | 4 |
| 20 | 2 | 3 | 2 | 1 | 4 |
| 30 | 3 | 2 | 3 | 1 | 4 |
| 40 | 4 | 1 | 4 | 1 | 4 |
| 50 | 5 | 1 | 4 | 1 | 4 |

4.3.4. Análise da β -Glicosidase na amostra utilizada nas curvas de Adição de Padrão

Primeiramente, com o solo homogeneizado, foram pesados 1,00 g (\pm 0,05 g) da amostra representativa em 4 erlenmeyers de 50 mL (1 controle e 3 replicatas). Usando uma micropipeta, adicionou-se 4,0 mL de tampão (MUB) em todos os erlenmeyers (controle e replicatas 1, 2 e 3). Em seguida, adicionou-se 1,0 mL de substrato (pNG) apenas nos erlenmeyers das replicatas 1, 2 e 3, enquanto o controle não recebe essa adição. As soluções foram agitadas manualmente e os erlenmeyers foram tampados com rolhas.

Todos os erlenmeyers foram colocados na estufa, onde permaneceram por 1 h a 37°C. Após o período de incubação, os erlenmeyers foram retirados da estufa. Em seguida, adicionou-se 1,0 mL de solução de CaCl_2 0,5 M e 4,0 mL de tampão THAM a todos os erlenmeyers. No controle, também foi adicionado 1,0 mL de substrato (pNG 0,025 M). As soluções foram homogeneizadas adequadamente. Por fim, um filtro qualitativo foi colocado nos funis, no qual foram suspensos por garras ou outro tipo de suporte, e as amostras foram filtradas cuidadosamente. E por último, as amostras foram submetidas à leitura em espectrofotômetro

UV-Vis a 400 nm, comprimento de onda correspondente ao máximo de absorvância, sendo as leituras realizadas em triplicata. A ordem de adição de reagentes se mostrou de fundamental importância, podendo levar a erros analíticos se não respeitada.

4.3.5. Análise comparativa de métodos na quantificação de β -glicosidase: Preparo Curvas de Adição de Padrão

Para a construção da curva de Adição de Padrão, seguiu-se o mesmo procedimento de preparo da amostra descrito no tópico 4.3.4. Após a etapa de filtração, as soluções foram devidamente homogeneizadas e retiraram-se 7,0 mL de cada replicata, garantindo assim a padronização do volume utilizado em todas as medições. Para facilitar o processo e evitar alterações significativas no volume final das alíquotas, preparou-se uma solução de p-nitrofenol mais concentrada (1000,0 $\mu\text{g/mL}$).

Inicialmente, realizou-se a leitura do controle e, em seguida, mediu-se a absorvância das três replicatas antes da adição do padrão, a 400 nm. Como a quantidade de amostra disponível era limitada e apresentava alta heterogeneidade, decidiu-se devolver as soluções aos seus respectivos frascos após as medições iniciais e realizar as adições de padrão diretamente nesses mesmos frascos. Ao todo, foram feitas cinco adições sucessivas de padrão, utilizando-se 0,1 mL da solução de p-nitrofenol (1000,0 $\mu\text{g/mL}$) em cada adição. A Tabela 3 apresenta os volumes de padrão adicionados e as quantidades de pNP correspondentes obtidas após cada etapa de adição.

Tabela 3 – Volumes adicionados nas curvas de Adição de Padrão da β -glicosidase

| Adição de padrão | Volume adicionado de pNP 1000,0 $\mu\text{g/mL}$ (mL) | Volume final da solução (mL) | pNP (μg) |
|------------------|---|------------------------------|-----------------------|
| 1 | 0,1 | 7,1 | 14 |
| 2 | 0,1 | 7,2 | 28 |
| 3 | 0,1 | 7,3 | 41 |
| 4 | 0,1 | 7,4 | 54 |
| 5 | 0,1 | 7,5 | 67 |

4.4. Metodologia para análise da Arilsulfatase

4.4.1. Reagentes e equipamentos para o preparo da curva de Arilsulfatase

Foram utilizados os seguintes materiais e reagentes: 4-nitrofenol (Sigma, código 1048-5G), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich), NaOH (Sigma-Aldrich). Os equipamentos e utensílios empregados incluíram erlenmeyers de 50 mL, rolhas de borracha, estufa, funis de vidro, papel filtro da marca Macherey-Nagel MN 616 md e balança analítica com precisão de quatro casas decimais (Shimadzu ATX24R). As medidas de absorvância foram realizadas no UV-Vis Agilent Modelo Cary 8454, com o software ChemStation.

4.4.2. Preparo Curva de Calibração Externa para a Arilsulfatase na Validação Analítica

Primeiramente, preparou-se uma solução estoque de p-nitrofenol 1000,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para isso, pesou-se 0,5010 g de p-nitrofenol (Sigma 104-8) em uma balança analítica de quatro casas decimais. Em um béquer de 500 mL, dissolveu-se o sólido em 400 mL de água de osmose reversa (OR), com auxílio de agitação magnética. Após todo sólido apresentar-se dissolvido, transferiu-a para um balão volumétrico de 500 mL, completando o volume com água de OR. A solução foi transferida para um frasco de vidro âmbar e armazenada na geladeira.

A partir da mesma solução-mãe, foram preparadas três soluções independentes para a construção das curvas de calibração na concentração de 25,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para isso, transferiu-se 2,5 mL da solução estoque para um balão volumétrico de 100 mL, o qual foi completado com água de OR. A partir da solução de p-nitrofenol (pNP) com concentração de 25,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, foram preparadas as soluções padrão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4: Preparo dos padrões da curva de Calibração Externa da Arilsulfatase

| Ponto | pNP (μg) | pNP ($\mu\text{g/mL}$) | Água de OR (mL) | pNP 25,0 $\mu\text{g/mL}$ (mL) | CaCl ₂ 0,5 M (mL) | NaOH 0,5 M (mL) |
|--------|--------------------------|-----------------------------|--------------------|-----------------------------------|---------------------------------|--------------------|
| Branco | 0,00 | 0,0 | 5,00 | 0,00 | 1,00 | 4,00 |
| 1 | 0,50 | 0,05 | 4,98 | 0,02 | 1,00 | 4,00 |
| 2 | 1,00 | 0,10 | 4,96 | 0,04 | 1,00 | 4,00 |
| 3 | 5,00 | 0,50 | 4,80 | 0,20 | 1,00 | 4,00 |
| 4 | 10,00 | 1,00 | 4,60 | 0,40 | 1,00 | 4,00 |
| 5 | 15,00 | 1,50 | 4,40 | 0,60 | 1,00 | 4,00 |
| 6 | 20,00 | 2,00 | 4,20 | 0,80 | 1,00 | 4,00 |
| 7 | 22,50 | 2,25 | 4,10 | 0,90 | 1,00 | 4,00 |
| 8 | 25,00 | 2,50 | 4,00 | 1,00 | 1,00 | 4,00 |
| 9 | 30,00 | 3,00 | 3,80 | 1,20 | 1,00 | 4,00 |
| 10 | 40,00 | 4,00 | 3,40 | 1,60 | 1,00 | 4,00 |
| 11 | 50,00 | 5,00 | 3,00 | 2,00 | 1,00 | 4,00 |
| 12 | 75,00 | 7,50 | 2,00 | 3,00 | 1,00 | 4,00 |
| 13 | 100,00 | 10,00 | 1,00 | 4,00 | 1,00 | 4,00 |
| 14 | 125,00 | 12,50 | 0,00 | 5,00 | 1,00 | 4,00 |

4.5. Procedimentos Experimentais

4.5.1. Determinação da linearidade e da faixa de trabalho da β -glicosidase e da Arilsulfatase

Ribani e colaboradores (2004) propuseram três procedimentos para verificar se os pontos experimentais de uma curva analítica estão inseridos na faixa linear dinâmica do método. Neste estudo, adotou-se a abordagem baseada no cálculo das respostas relativas (RR), conforme descrito na Equação 2.

$$RR = \frac{\text{ sinal obtido (absorbância) }}{\text{ concentração }} \quad \text{Equação 2}$$

Para avaliar a faixa de trabalho, constrói-se um gráfico em que as respostas relativas (RR) são representadas no eixo “y” e as massas correspondentes, em escala logarítmica, no eixo “x”. As RR são traçadas no gráfico e, idealmente, formam uma linha horizontal ao longo da faixa

linear dinâmica. No entanto, a linearidade é considerada adequada até o ponto em que as RR permanecem dentro do intervalo de 80% a 120%, limite comumente aceito para ensaios biológicos (Ribani *et al.*, 2004). Já a linearidade, foi calculada a partir do R² do gráfico da quantidade de massa de pNP em µg versus absorbância. (Brasil, 2017).

4.5.2. Determinação do LQ e LD para a β-glicosidase e para Arilsulfatase

A fim de determinar os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), foi elaborada uma curva de Calibração Externa para β-glicosidase e para a arilsulfatase. O preparo seguiu os procedimentos descritos por Tabatabai (1994), em conformidade com o protocolo operacional padrão recomendado pela FAO (2025).

Primeiramente, a leitura da solução branco foi feita no espectrofotômetro UV-Vis utilizando a função “blank”. Em seguida, cada ponto da curva foi avaliado em triplicata por meio da função “sample”, com leituras realizadas nos comprimentos de onda de 400 nm (início da faixa de detecção do pNP e pico de absorbância determinado pelo equipamento) e 420 nm (limite superior da faixa de leitura do pNP), conforme pode ser observado na Figura 6 abaixo.

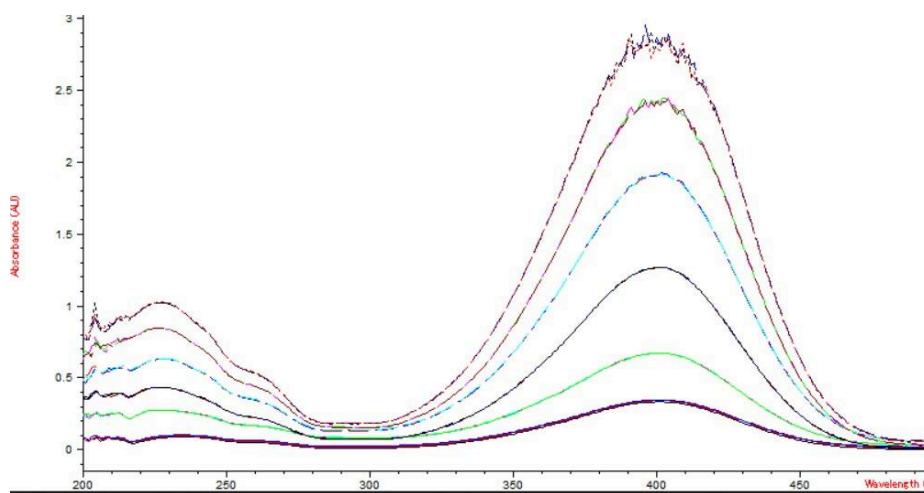


Figura 6: Espectro de Absorção do pNP.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) dos métodos analíticos foram estabelecidos conforme as orientações da RDC n° 166/2017 (Brasil, 2017). O cálculo do limite de detecção (LD) e do Limite de Quantificação (LQ) foi realizado utilizando as Equações 3 e 4, respectivamente:

$$LD = \frac{3,3 \sigma}{a} \quad \text{Equação 3}$$

$$LQ = \frac{10 \sigma}{a} \quad \text{Equação 4}$$

Onde: a representa o coeficiente angular da curva de calibração e σ corresponde ao desvio padrão, obtido a partir do desvio padrão residual da linha de regressão, conforme descrito na Equação 5. O desvio padrão residual (σ) foi determinado com base nos resíduos (r), obtidos conforme a Equação 5.

$$\text{Resíduo} = y_{\text{medido}} - y_{\text{esperado}} \quad \text{Equação 5}$$

Posteriormente, o desvio padrão dos resíduos foi calculado utilizando a Equação 6 (Miller, 2010):

$$\text{Desvio do Resíduo} = \sqrt{\frac{\Sigma(\text{resíduo})^2}{(n-2)}} \quad \text{Equação 6}$$

4.5.3. Verificação da Estabilidade do pNG, pNS e pNP

Para a verificação da estabilidade dos compostos pNG, pNS e pNP, foram preparadas soluções dos respectivos reagentes utilizados no experimento. Inicialmente, foram elaboradas três soluções-estoque com as seguintes concentrações: 0,025 mg/L para pNS e pNG, e 1 g/L para pNP.

A partir dessas soluções-estoque, realizaram-se diluições na razão 1:10 (1 mL da solução-estoque completado para 10 mL com água), resultando numa concentração de 2,5 µg/L para o pNS e para o pNG, e de 0,1 g/L para o pNP, a fim de obter concentrações compatíveis com a faixa de linearidade da Lei de Lambert-Beer ($0,01 < A < 2,5$) (Mettler Toledo, 2023). As soluções diluídas a partir das soluções-estoque foram preparadas em triplicata e no mesmo dia das leituras espectrofotométricas, a fim de minimizar possíveis variações associadas ao tempo de armazenamento.

As leituras foram realizadas em triplicata, garantindo maior confiabilidade dos resultados. O procedimento de monitoramento da estabilidade foi repetido a cada 10 dias, ao longo de um período total de 125 dias (10 de Outubro a 12 de Fevereiro), permitindo avaliar a constância das respostas analíticas dos reagentes pNG, pNS e pNP ao longo do tempo.

4.5.4. Avaliação da secagem das amostras

As amostras utilizadas neste ensaio foram coletadas em momento posterior àquelas empregadas na avaliação comparativa entre os métodos de Calibração Externa e Adição de Padrão, tratando-se de coletas distintas e planejadas para finalidades experimentais específicas. Para a verificação da eficiência do processo de secagem das amostras, foram coletados solos provenientes de dois locais distintos, selecionados de modo a representar diferentes condições de umidade.

O primeiro solo foi coletado no Parque Olhos d'Água, por se tratar de um ambiente caracterizado por solo naturalmente mais úmido. Os outros dois solos foram obtidos em uma fazenda com plantação de milho e hortaliças, localizada na Chácara Carangola, situada na Lagoa do Pato Selvagem, em Cocalzinho-GO, área representativa de solo agrícola com menor teor de umidade, solos ideais para serem comparados ao padrão de secagem de amostras mais úmidas.

Essa estratégia de amostragem permitiu avaliar a capacidade de secagem tanto de um solo úmido quanto de um solo mais seco, possibilitando uma análise comparativa do comportamento do processo de secagem em condições edáficas distintas, com ênfase em solos agrícolas. Antes de realizar a coleta desses solos, foram removidos a vegetação e outros elementos presentes na superfície, como galhos e pedras, cuidadosamente, para não retirar a camada superficial do solo nem remover a matéria orgânica. Em seguida, utilizando uma pá, o solo foi coletado na profundidade de 0 a 10 mm. As amostras foram coletadas individualmente e acondicionadas em três sacos plásticos distintos, devidamente identificados com o local, a data de coleta e o tipo de amostra.

Os solos foram amostrados no mês de setembro e outubro, e o estudo foi conduzido em dois períodos sazonais contrastantes: durante a estação seca (setembro de 2025) e durante o período chuvoso (outubro de 2025), com a realização de medições ao longo de 22 dias em cada período, exceto aos domingos. As pesagens no mês de setembro iniciaram-se dia 08 e foram até dia 29. Em outubro, iniciaram-se no dia 6 e foram até o dia 27.

Para as análises, as amostras foram peneiradas em peneira de 4 mm, a fim de garantir a homogeneização. Além disso, foram pesadas em triplicata e distribuídas em placas de Petri, sendo cada replicata composta inicialmente por aproximadamente 10 g de solo ($\pm 0,05$ g). As placas foram recobertas com papel alumínio perfurado e acondicionadas em suporte posicionado na bancada destinada às análises enzimáticas, no laboratório AQQUA. Esse procedimento foi adotado com o objetivo de minimizar possíveis contaminações, ao mesmo tempo em que se manteve a adequada circulação de ar, garantindo as condições necessárias para a secagem controlada das amostras.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise comparativa entre os métodos de Calibração Externa e Adição de Padrão

Foi realizada uma avaliação comparativa entre os resultados obtidos para uma mesma amostra (solo do jardim do Instituto de Química), utilizando os métodos de Calibração Externa e de Adição de Padrão. A comparação entre os dois valores obtidos foi conduzida por meio de um teste t de Student com nível de significância de 95%, para comparação de duas médias independentes.

5.1.1. Curva de calibração com padrões externos para β -glicosidase

A absorbância de cada ponto da curva de Calibração Externa foi medida em triplicata e as médias desses valores, assim como as respectivas concentrações estão apresentadas na Tabela 5 abaixo. Neste caso, diferentemente da curva de Calibração Externa elaborada para a validação do método, os pontos experimentais não foram preparados em triplicatas autênticas.

Tabela 5 – Dados para construção da curva de Calibração Externa para a β -glicosidase

| Pontos | Média analítica | DP | Massa de pNP (μg) |
|-----------------|------------------------|---------|--------------------------------|
| P1 | 0,0200 | 0,00012 | 0 |
| P2 | 0,1444 | 0,00035 | 10 |
| P3 | 0,2953 | 0,00142 | 20 |
| P4 | 0,4418 | 0,00111 | 30 |
| P5 | 0,5909 | 0,00213 | 40 |
| P6 | 0,7416 | 0,00608 | 50 |
| Equação da Reta | $y = 0,0149x - 0,0042$ | | |
| R^2 | 0,9998 | | |

Com base nos dados obtidos experimentalmente, foi possível construir a representação gráfica apresentada na Figura 7, a qual permite visualizar a relação entre as variáveis analisadas e verificar a linearidade do método. A faixa da curva analítica foi definida conforme as características da matriz, considerando a baixa atividade esperada da enzima na amostra. Os desvios-padrão foram incorporados à curva apresentada a seguir; entretanto, em razão de sua magnitude reduzida, não são visualmente discerníveis na representação gráfica.

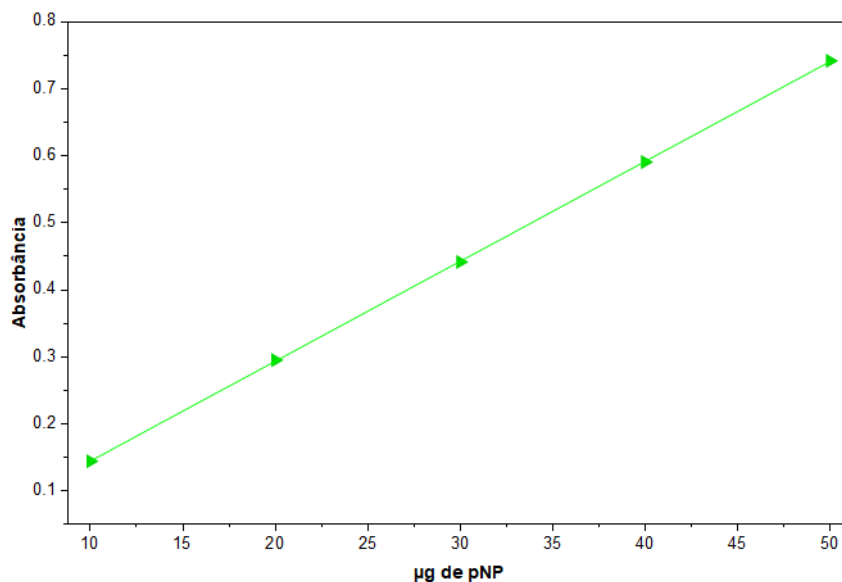


Figura 7: Gráfico da Curva de Calibração Externa para a β -glicosidase

As leituras de absorvância de cada replicata da amostra foram realizadas em triplicata no espectrofotômetro, e as médias dessas medidas foram calculadas a partir da curva analítica detalhada na seção 4.5.1. Com isso, a Tabela 6 foi elaborada, apresentando as concentrações obtidas para cada replicata, bem como a média entre elas e o respectivo desvio padrão.

Tabela 6 – Resultados da análise por Calibração Externa

| | Absorbância (média) | Massa (μg) | Massa de solo (g) | Concentração (μg de pNP/g solo.h a 37 °C) |
|--------|------------------------|----------------------------|----------------------|--|
| A1 | 0,4392 | 29,76 | 1,00 | 29,76 |
| A2 | 0,3764 | 25,54 | 1,01 | 25,30 |
| A3 | 0,4913 | 33,25 | 1,01 | 32,93 |
| Média | - | 29,52 | - | 29,32 |
| DP | - | 3,86 | - | 3,84 |
| IC 95% | - | 4,37 | - | 4,34 |

De acordo com os dados apresentados na Tabela 6, a concentração de pNP liberado pela ação da enzima β -glicosidase na amostra de solo proveniente do jardim do IQ foi de $29,32 \pm 4,34$ μg de pNP por litro, por grama de solo, por hora, a 37 °C.

5.1.2. Curva de calibração com Adição de Padrão para β -glicosidase

Como esse método requer a construção individual da curva analítica para cada amostra, foi elaborado um gráfico com as três retas obtidas, conforme Figura 8. Na Tabela 7 abaixo estão representados os dados referentes às curvas construídas. Para a construção de cada curva, foram pesados $1,00 \pm 0,05$ g de solo e, após a adição dos reagentes descritos no item 4.3.4, as amostras foram filtradas e homogeneizadas; em seguida, alíquotas de 7 mL de cada replicata foram retiradas para padronização dos volumes na construção das curvas de Adição de Padrão.

Tabela 7– Dados para construção das curvas com Adição de Padrão para a β -glicosidase

| Pontos | Massa (μg de pNP) | Média Curva 1 | Média Curva 2 | Média Curva 3 |
|-----------------|----------------------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|
| P1 | 0 | 0,4392 | 0,3764 | 0,4913 |
| P2 | 14 | 0,6393 | 0,6090 | 0,6881 |
| P3 | 28 | 0,7720 | 0,8165 | 0,8314 |
| P4 | 41 | 0,8722 | 0,9967 | 0,9441 |
| P5 | 54 | 1,0518 | 1,1600 | 1,0364 |
| P6 | 67 | 1,1576 | 1,2612 | 1,1907 |
| Equação da Reta | | $y = 0,01x + 0,4918$ | $y = 0,0125x + 0,4589$ | $y = 0,0092x + 0,564$ |
| R^2 | | 0,9923 | 0,9885 | 0,9945 |

A partir das curvas analíticas obtidas pelo método de Adição de Padrão (Figura 8), foi possível calcular as concentrações dos produtos formados em cada uma das 3 replicatas da amostra. As leituras de absorbância foram realizadas em triplicata para cada réplica, utilizando espectrofotometria, e as médias dessas leituras foram utilizadas para o cálculo final das concentrações. Adotando-se $y=0$ nas equações fornecidas por cada gráfico, foi possível encontrar a concentração de cada replicata.

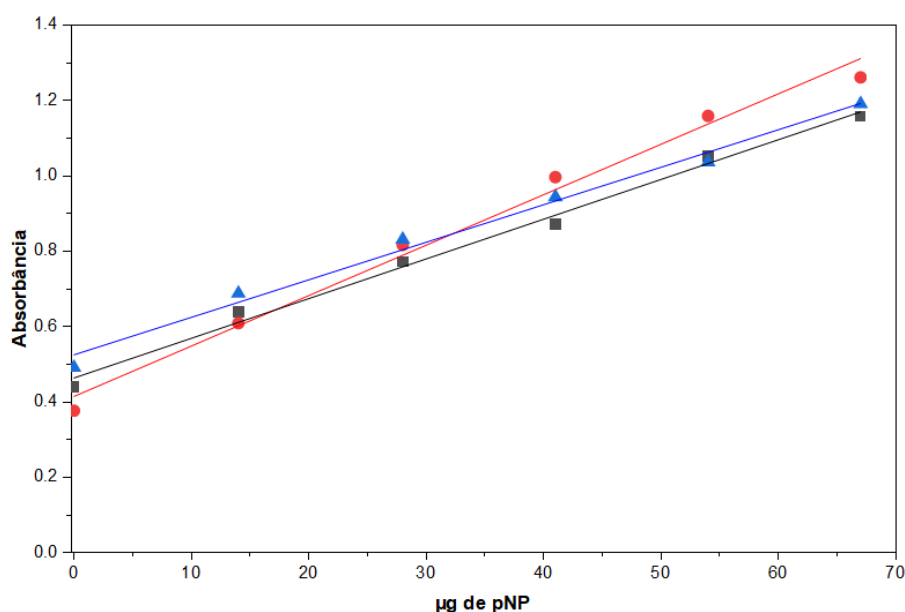


Figura 8: Gráfico curvas Adição de Padrão para a β -glicosidase
Legenda: Curvas de Adição de Padrão em triplicata (azul, preto e vermelho)

Com base nesses dados, elaborou-se a Tabela 8, na qual estão apresentadas as concentrações determinadas para cada replicata, bem como a média entre elas e o respectivo desvio padrão, permitindo uma avaliação da reprodutibilidade e da variabilidade dos resultados analíticos

Tabela 8 – Resultados da análise por Adição de Padrão

| | Massa (μg de pNP) | Massa de solo (g) | Concentração (μg de pNP/g solo.h a 37 °C) |
|--------|----------------------------------|----------------------|--|
| A1 | 49,18 | 1,00 | 49,18 |
| A2 | 36,71 | 1,01 | 36,35 |
| A3 | 61,30 | 1,01 | 60,70 |
| Média | 49,06 | - | 48,74 |
| DP | 12,29 | - | 12,18 |
| IC 95% | 30,54 | - | 30,25 |

A concentração da mesma amostra pela análise com Adição de Padrão foi, então, igual a $48,74 \pm 30,25 \mu\text{g/g}$ de solo.h a 37°C. A amplitude da dispersão dos resultados reflete a variabilidade intrínseca da amostra, marcada por sua heterogeneidade elevada, e também representa um indicativo dos erros atribuídos ao preparo das curvas, pelo fato de devolver as soluções aos seus respectivos frascos após as medições iniciais e realizar as adições de padrão diretamente nesses mesmos frascos.

5.1.3. Comparação entre os métodos de Calibração Externa e Adição de Padrão

Com o intuito de comparar os resultados fornecidos pelos dois métodos, foi aplicado o teste t de Student para comparação de duas médias independentes, e o t_{calc} foi obtido a partir da Equação 7 abaixo (Skoog, 2006).

$$|t_{calc}| = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{s_1^2}{m_1} + \frac{s_2^2}{m_2}}} \quad \text{Equação 7}$$

Nessa equação anterior, \bar{x}_1 e \bar{x}_2 representam as médias das concentrações encontradas pelo Método de Calibração Externa (MCE) e pelo Método de Adição de Padrão (MAP), respectivamente. Além disso, m_1 e m_2 correspondem, respectivamente, ao número de réplicas do MCE e ao número de réplicas do MAP.

A variância associada ao método de calibração externa (MCE) foi determinada a partir da Equação 8, que estima o desvio-padrão da concentração a partir do erro residual da regressão ($s_{y/x}$) e da sensibilidade (b), incorporando tanto a contribuição das replicatas do sinal do desconhecido ($1/m$) quanto o efeito da sua posição em relação ao centro da curva $[(y_0 - \bar{y})^2]$; a variância (s^2) foi obtida elevando-se esse desvio-padrão ao quadrado (Skoog, 2006).

$$S = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

Equação 8

Para o método de adição padrão (MAP), a variância foi obtida por meio da Equação 9, na qual a incerteza é calculada sem o termo ($1/m$), uma vez que a estimativa do desconhecido é realizada a partir da própria regressão construída na matriz da amostra, substituindo o termo de posição da calibração externa por um termo baseado no sinal ajustado (\hat{y}^2); de modo análogo, a variância (s^2) foi obtida elevando-se o desvio-padrão ao quadrado.

$$S = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\hat{y}^2}{b^2 \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

Equação 9

A partir das equações listadas anteriormente foi possível calcular um valor de t_{calc} igual a 7,14 (Tabela 9). Como o valor calculado de t_{calc} foi superior ao valor tabelado de t_{tab} ($7,14 > 4,303$) a hipótese nula foi rejeitada, indicando que há diferença estatisticamente significativa entre os valores de concentração obtidos pelos dois métodos. Dessa forma, é possível afirmar que os métodos não apresentam equivalência estatística nas condições experimentais adotadas, indicando um efeito significativo da matriz do solo na determinação de pNP.

Isso pode ser justificado pelo fato do MCE ser mais indicado quando o efeito de matriz é inexistente ou desprezível, uma vez que os padrões são preparados em meio distinto da amostra e, portanto, não reproduzem as possíveis interações físico-químicas entre matriz e analito. Nessas condições, assume-se que a resposta instrumental depende da concentração do analito, sem influência significativa de espécies concomitantes. Entretanto, em matrizes complexas, essa abordagem pode comprometer a exatidão dos resultados. Já para o MAP, o efeito de matriz será levado em conta, uma vez que o padrão estará inserido no ambiente químico dessa matriz, e as interações serão mantidas (Skoog, 2006).

Sendo assim, de acordo com Silva e colaboradores (2025), para minimizar os efeitos de matriz do solo na absorvância de pNP, recomendam-se o Método de Adição Padrão de Múltiplos Pontos (MAPMP) e o Método de Adição de Padrão de Ponto Único (MAPPU), por fornecerem estimativas mais acuradas da concentração do analito. Os autores verificaram ainda que o MAPPU, além de ser mais rápido que o MAPMP por requerer apenas duas leituras por amostra (uma sem e outra com uma única adição de padrão), apresenta eficiência equivalente à do MAPMP, configurando-se como a melhor alternativa entre os métodos avaliados.

Tabela 9 - Teste t de Student comparação entre médias com 95% de confiança

| t_{cal} | t_{tab}^* |
|-----------|-------------|
| 7,14 | 4,303 |

*Valor de t tabelado para $n - 1 = 2$ graus de liberdade e 95% de confiança.

A magnitude do valor de t obtido (7,14) evidencia que a discrepância entre as médias não é apenas estatisticamente significativa, mas também expressiva do ponto de vista analítico. Isso indica que, sob as condições estudadas, um dos métodos tende a produzir resultados consistentemente distintos do outro, pois os resultados mostraram a ausência de equivalência entre as metodologias, ou seja, tratam-se maneiras distintas de medir a quantidade de pNP. A análise comparativa das concentrações determinadas demonstra que a variação observada não pode ser negligenciada, sobretudo quando se consideram aplicações que exigem elevada exatidão e confiabilidade.

Os achados sugerem a necessidade de uma avaliação mais aprofundada das etapas envolvidas na metodologia, como preparo de amostra, construção da curva analítica e parâmetros instrumentais. A investigação desses aspectos pode contribuir para identificar a origem da

discrepância observada, permitindo ajustes metodológicos. Também foi possível interpolar os dados do MAP e do MCE, conforme ilustrado na Figura 9. Os resultados obtidos são semelhantes aos dados apresentados por Silva e colaboradores (2025), cujo estudo também apontou uma tendência à subestimação da concentração do analito quando se utiliza a Calibração Externa.

Essa tendência pode ser atribuída à influência significativa do efeito de matriz do solo na determinação de pNP, devido à adsorção desse analito nesse método. Conforme relatado por Silva e colaboradores (2025), solos com matrizes mais complexas, caracterizadas por maior teor de matéria orgânica e textura mais fina, apresentaram discrepâncias mais acentuadas nas estimativas de atividade enzimática quando comparadas as curvas de Adição Padrão de Múltiplos Pontos e de Padrão Externo de Múltiplos Pontos. Corroborando esses achados, a Análise de Componentes Principais (ACP) realizada no estudo citado indicou que tais atributos edáficos estiveram associados à variação observada, sugerindo que a composição e as características físico-químicas do solo desempenham papel determinante na magnitude do efeito de matriz durante a quantificação de pNP.

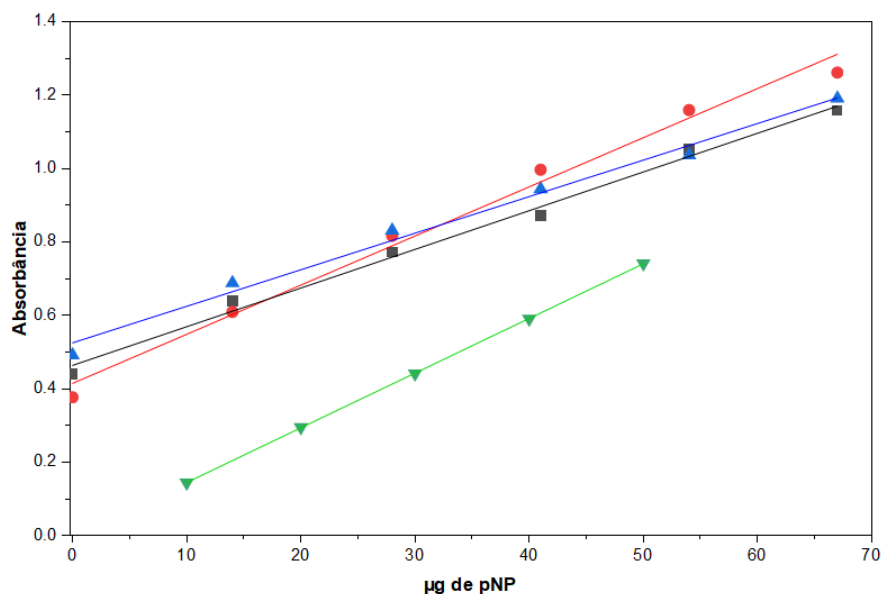


Figura 9: Gráfico curvas Adição de Padrão e Calibração Externa para a β -glicosidase
Legenda: Curvas de Adição de Padrão (azul, preto e vermelho) e Curva de Calibração Externa (verde)

Dessa forma, a fim de minimizar a possível subestimação dos resultados, recomenda-se a adoção de estratégias capazes de atenuar o efeito de matriz, como o emprego do método de Adição de Padrão, seja na forma de ponto único ou de múltiplos pontos, os quais se mostraram

equivalentes no estudo publicado por Silva e colaboradores (2025), bem como a utilização de fatores de correção obtidos por meio de ensaios de recuperação. Essas medidas favorecem maior precisão, exatidão e confiabilidade nas determinações analíticas.

Adicionalmente, a análise gráfica demonstrou que, ao se plotar os valores de absorvância do MAP em função das absorvâncias do MCE, observou-se uma relação linear bem definida, indicando boa correlação entre os métodos e sugerindo que o MCE, mesmo subestimando os valores, apresenta comportamento sistemático e previsível sob as condições analisadas. Além disso, também foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson para as duas retas, gerando um valor de $r = 0,9989$, indicando uma fortíssima correlação linear positiva entre os conjuntos de dados representados por essas retas, como pode ser visto na Figura 10.

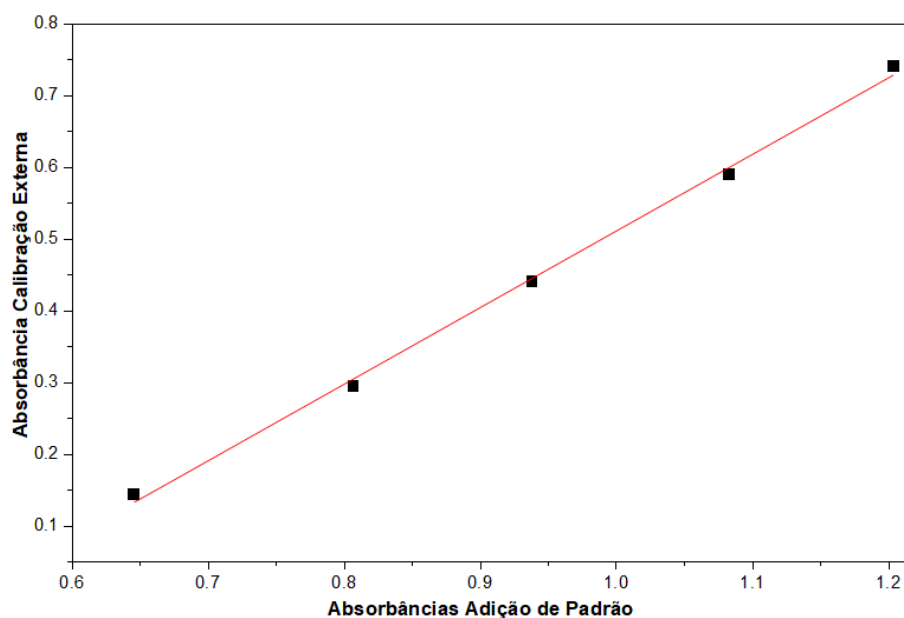


Figura 10: Gráfico curva analítica Adição de Padrão versus Calibração Externa
Legenda: Equação da reta: $y = 1,0687x - 0,5566$; $R^2: 0,9978$; $r = 0,9989$

Essa avaliação foi realizada exclusivamente para a enzima β -glicosidase. Entretanto, conforme descrito por Silva e colaboradores (2025), procedimento semelhante foi aplicado à enzima arilsulfatase, cujos resultados igualmente evidenciaram subestimação das concentrações ao empregar o método de Calibração Externa, além de demonstrarem forte correlação linear entre os dados obtidos pelos dois métodos.

5.2. Avaliação das Curvas de Calibração, do LQ e LD para a β -glicosidase: Validação Analítica do MCE

Apesar de já comprovado que os dois métodos (MCE e MAP) não são equivalentes, realizamos a validação analítica do MCE por ser este método utilizado nos protocolos da FAO e da Embrapa. Para isso foram avaliados a linearidade, a faixa de trabalho, a precisão e os limites de detecção e quantificação.

Para estas avaliações, as leituras de absorbância para a β -glicosidase foram realizadas a 400 nm e 420 nm. A Tabela 10 apresenta um resumo de alguns parâmetros analíticos do método otimizado. A linearidade da curva foi verificada por meio do coeficiente de determinação (R^2), que atingiu o valor maior que 0,999 para o comprimento de onda de 400 nm, evidenciando uma excelente linearidade do método, no entanto, o comprimento de onda de 420 nm apresentou uma leve queda no coeficiente de determinação.

Além disso, a excelente linearidade obtida em 400 nm ($R^2 > 0,999$, Tabela 10) confirma a confiabilidade dos resultados dentro da faixa de trabalho utilizada sob as condições avaliadas e assumindo-se a ausência de interferências significativas da matriz do solo (efeito de matriz desconsiderado). Portanto, esses resultados indicam que o método desenvolvido possui desempenho satisfatório para aplicações ambientais e laboratoriais, sendo capaz de detectar e quantificar a atividade da β -glicosidase em solos com boa precisão e robustez.

Tabela 10 - Parâmetros analíticos de quantificação para a β -glicosidase

| | Equação da Reta | R^2 | LD (μ g) | LQ (μ g) |
|--------|------------------------|--------|---------------|---------------|
| 400 nm | $y = 0,0128x + 0,0305$ | 0,9991 | 3,83 | 11,62 |
| 420 nm | $y = 0,0098x + 0,031$ | 0,9986 | 4,98 | 15,09 |

A Figura 11 abaixo apresenta o gráfico das curvas analíticas para a β -glicosidase nos comprimentos de onda de 400 nm e 420 nm, e a Figura 12 apresenta os espectros de absorção correspondentes a cada valor de pNP.

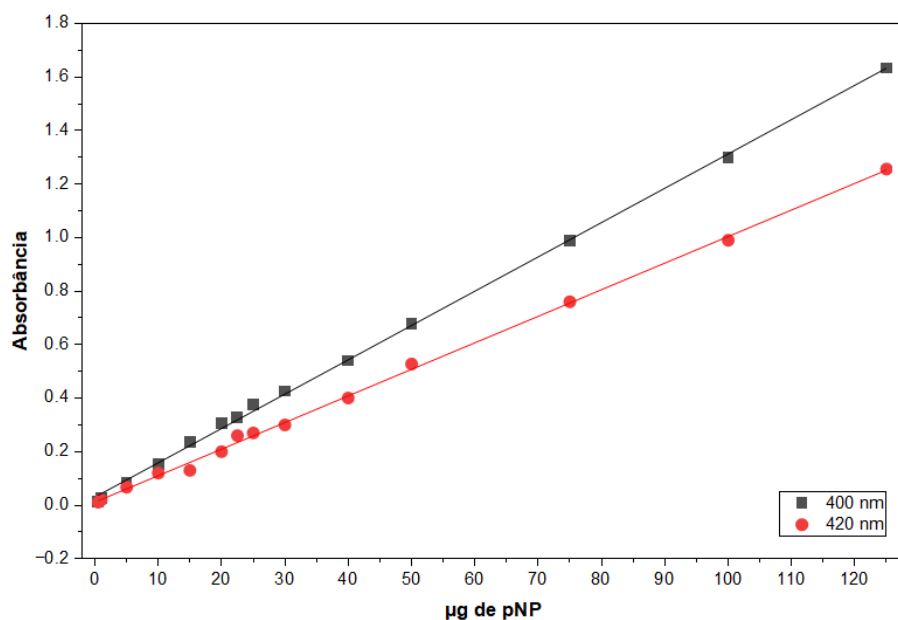


Figura 11: Curvas analíticas para a β -glicosidase a 400 e 420 nm.
 Legenda: Curva Analítica a 400 nm (preto) e 420 nm (vermelho)

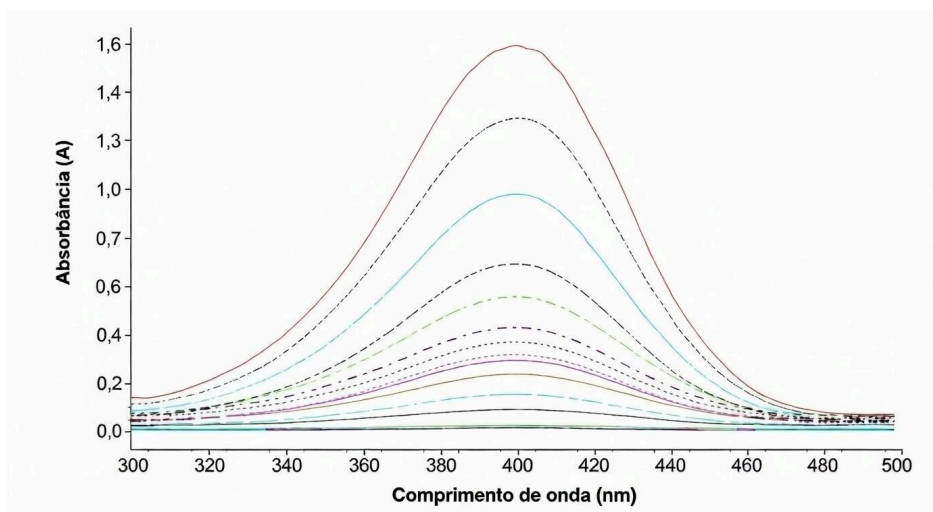


Figura 12: Absorbância dos padrões da curva analítica com massas entre 0,5 a 125 μ g.

A análise do gráfico evidencia que a curva obtida no comprimento de onda de 400 nm apresentou uma linearidade satisfatória, atendendo ao critério de $R^2 > 0,990$ estabelecido pela RDC nº 166/2017 da Anvisa. Por outro lado, observa-se que a curva correspondente à leitura em 420 nm apresenta uma inclinação inferior em relação à de 400 nm, evidenciando uma redução na sensibilidade do método nesta faixa espectral.

A mesma comparação é possível ser feita em relação aos limites de detecção e quantificação. Observa-se que os menores valores de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram obtidos no comprimento de onda de 400 nm, com LD de 3,83 µg e LQ de 11,62 µg, indicando maior sensibilidade do método nessa faixa. Em contrapartida, no comprimento de 420 nm, os valores de LD e LQ foram mais elevados (LD de 4,98 µg e LQ de 15,09 µg), sugerindo que comprimentos de onda afastados do máximo de absorção do pNP resultam em menores coeficientes de absorvidade molar, exigindo quantidades maiores do analito para que o sinal seja distinguível do ruído de fundo. Consequentemente, concentrações mais baixas podem não ser detectadas ou quantificadas com precisão, limitando a aplicabilidade dessa faixa espectral para amostras com baixos teores de pNP (Harris, 2015).

Entretanto, considerando a influência da concentração do pNP na resposta espectrofotométrica, verificou-se que, em condições de maior concentração, a leitura a 420 nm foi a mais adequada. Essa escolha se mostrou vantajosa devido à redução expressiva das interferências ópticas observadas em comprimentos de onda menores, como 400 nm, que geram ruídos no topo do pico de absorbância e comprometem a definição do sinal analítico. Nesse contexto, a adoção do comprimento de onda de 420 nm permitiu maior precisão e reprodutibilidade nos resultados para os pontos mais concentrados da curva, evidenciando a importância da adequação dos parâmetros instrumentais às particularidades das amostras a serem analisadas.

Por fim, nota-se que em ambas as regressões lineares, o valor do coeficiente de determinação R^2 foi superior ao critério estabelecido pela Resolução RDC nº 166/2017 da Anvisa, que recomenda valores acima de 0,990 para validação da linearidade (Brasil, 2017). Esses resultados indicam um ajuste excelente dos dados experimentais às respectivas equações lineares, confirmando a linearidade do método dentro da faixa de trabalho avaliada.

5.3. Avaliação das Curvas de Calibração, do LQ e LD para a Arilsulfatase: Validação Analítica do MCE

Como já discutido anteriormente para a enzima β -glicosidase, embora os métodos de calibração externa (MCE) e de adição padrão (MAP) não sejam equivalentes, optou-se por validar analiticamente o MCE por ser o procedimento adotado nos protocolos da FAO e da

Embrapa. Para tanto, foram avaliados a linearidade, a faixa de trabalho, a precisão e os limites de detecção e quantificação.

Para estas avaliações, as leituras de absorbância para a arilsulfatase foram realizadas a 400 nm e 420 nm. A Tabela 11 apresenta um resumo de alguns parâmetros analíticos do método otimizado. A linearidade da curva foi avaliada por meio do coeficiente de determinação (R^2), que apresentou valores superiores a 0,99, conforme Figura 13, para os dois comprimentos de onda analisados, evidenciando excelente linearidade do método.

Quando comparados aos valores descritos na literatura, esses resultados demonstram sensibilidade adequada para a análise de arilsulfatase em amostras de solo. Além disso, a elevada linearidade obtida assegura a confiabilidade dos resultados dentro da faixa de trabalho estabelecida. Portanto, os dados obtidos indicam que o método otimizado, sob as condições avaliadas e assumindo-se a ausência de interferências significativas da matriz do solo (efeito de matriz desconsiderado), apresenta desempenho satisfatório para aplicações ambientais e laboratoriais, sendo eficaz na detecção e quantificação da atividade da arilsulfatase em solos, com boa precisão e robustez.

Tabela 11 - Parâmetros analíticos de quantificação para a Arilsulfatase

| | Equação da Reta | R^2 | LD (μg) | LQ (μg) |
|--------|------------------------|--------|----------------------|----------------------|
| 400 nm | $y = 0,0134x + 0,0215$ | 0,9982 | 5,42 | 16,43 |
| 420 nm | $y = 0,0104 + 0,0227$ | 0,9976 | 6,46 | 19,58 |

A Figura 13 abaixo apresenta os gráficos das curvas analíticas para a Arilsulfatase nos comprimentos de onda de 400 nm e 420 nm.

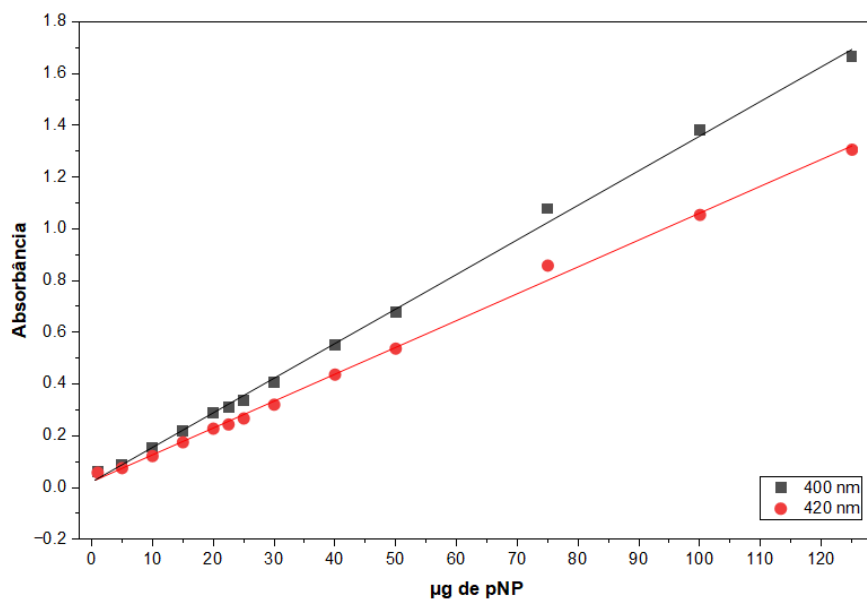


Figura 13: Gráfico curvas analíticas para a Arilsulfatase
 Legenda: Curva Analítica a 400 nm (preto) e 420 nm (vermelho)

Ao comparar os limites de detecção e quantificação obtidos para os diferentes comprimentos de onda utilizados na análise da arilsulfatase, observa-se que os menores valores de LD e LQ foram alcançados no comprimento de 400 nm (LD = 5,42 e LQ = 16,43). Isso indica que, nessa faixa, o método apresenta maior sensibilidade, permitindo detectar e quantificar concentrações menores do produto da reação enzimática.

Por outro lado, no comprimento de onda de 420 nm, os valores de LD e LQ foram ligeiramente superiores (LD = 6,46 µg e LQ = 19,58 µg), demonstrando redução da sensibilidade analítica nessa faixa espectral. Essa diferença sugere que, embora o método mantenha boa linearidade e aplicabilidade em 420 nm, ele se torna menos eficiente para detectar concentrações muito baixas do produto.

No entanto, conforme comentado anteriormente, verificou-se que as amostras mais concentradas apresentaram maior interferência óptica em comprimentos de onda mais baixos, conforme evidenciado na Figura 14, na qual as linhas vermelhas marcam as leituras em 400 nm, 401 nm, 410 nm e 420 nm, respectivamente. Observou-se que, nas menores faixas de comprimento de onda, houve maior ruído no topo do pico de absorbância, prejudicando a definição do sinal analítico. Nesse contexto, a leitura em 420 nm mostrou-se mais adequada. Assim, embora ocorra uma discreta redução na sensibilidade, a utilização de 420 nm para amostras mais concentradas contribui para maior precisão e reprodutibilidade dos resultados,

evidenciando a importância da seleção criteriosa dos parâmetros analíticos de acordo com as características da amostra.

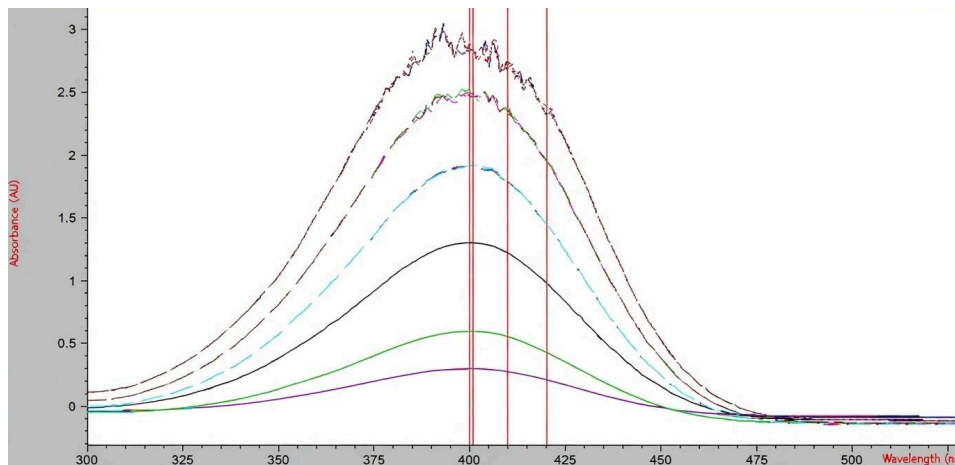


Figura 14: Espectros de absorção do pNP com destaque (linhas verticais) para os comprimentos de onda de 400, 401, 410 e 420 nm.

Assim, a análise comparativa mostra que, para a determinação da arilsulfatase, o comprimento de 400 nm oferece maior sensibilidade e melhor desempenho analítico, sendo preferíveis ao 420 nm, especialmente quando se busca detectar baixos níveis de atividade enzimática no solo. Já quando se deseja analisar concentrações mais elevadas, o comprimento de 420 nm pode ser o mais adequado, por reduzir possíveis interferências.

Além disso, na construção de curvas analíticas, não é estatisticamente adequado forçar a reta de calibração a passar pela origem (0,0), exceto quando houver evidência experimental e comprovação estatística de que o intercepto não difere significativamente de zero. A inclusão arbitrária do ponto zero desconsidera contribuições inerentes ao sistema analítico, como sinal residual, ruído instrumental, aumento das incertezas nas extremidades dos gráficos e possíveis efeitos de matriz, podendo introduzir viés sistemático na estimativa dos parâmetros da regressão, sobretudo no coeficiente angular e no intercepto (Skoog, 2006).

A imposição da origem como ponto da reta reduz artificialmente a variabilidade do modelo e pode resultar em subestimação ou superestimação das concentrações calculadas a partir da equação da curva. Esse procedimento compromete a exatidão e a rastreabilidade dos resultados analíticos, sobretudo em faixas de baixa concentração. Ressalta-se que alguns documentos técnicos e Procedimentos Operacionais Padrão (POP), como o POP da FAO (Food and Agriculture Organization) publicado em 2025 (Mendes, 2025), ainda apresentam a prática de

incluir o ponto zero na regressão sem a devida validação estatística, o que pode ocasionar erro sistemático na estimativa da concentração das enzimas quantificadas. Portanto, a decisão de incluir ou excluir o ponto zero deve ser baseada em critérios estatísticos e validação experimental, e não em convenção operacional.

Por fim, observa-se que, em ambas as retas (Figura 13) os coeficientes de determinação (R^2) foram superiores a 0,990, valor mínimo estabelecido pela Anvisa (Brasil, 2017), atingindo, aproximadamente, 0,998 nos dois comprimentos de onda avaliados. Esses resultados indicam que a resposta analítica, expressa pela absorbância, apresenta proporcionalidade direta com a concentração (massa) do analito no intervalo estudado, evidenciando a adequada reprodutibilidade e a previsibilidade do método.

5.4. Investigação da Faixa Linear

5.4.1. Faixa Linear β -Glicosidase

A avaliação da faixa de linearidade do método para determinação da atividade da β -glicosidase também foi analisada utilizando os comprimentos de onda de 400 nm e 420 nm. As respostas obtidas demonstraram ser consistentes em um amplo intervalo de massas de p-nitrofenol, de 5,0 a 125,0 μ g, com valores de resposta relativa (RR) variando dentro dos limites de aceitação estabelecidos entre 80% e 120% da mediana, como pode ser visto nas Figuras 15 e 16 abaixo. Nas massas mais baixas (5,0 e 10,0 μ g), apesar de ainda aceitáveis, observa-se uma maior variabilidade, possivelmente decorrente de maior suscetibilidade a interferências instrumentais ou da matriz próxima ao limite de detecção.

Ao excluir os dois primeiros pontos da curva, a faixa linear torna-se mais robusta e estável, abrangendo massas entre 5,0 e 125,0 μ g, onde os valores de RR mantêm-se ainda mais próximos da mediana e dentro dos critérios de linearidade. Essa exclusão pode ser recomendada quando se busca maior precisão e confiabilidade na faixa principal de trabalho do método, garantindo a estabilidade da resposta e a precisão na quantificação da atividade enzimática em amostras de solo.

Dessa forma, com base nos gráficos apresentados abaixo, verifica-se de forma mais clara que os dois primeiros pontos da curva ultrapassam a faixa de tolerância da linearidade dinâmica nos comprimentos de onda analisados (400 e 420 nm). Tal comportamento sugere que as massas

de 0,5 e 1,0 μg situam-se abaixo dos limites de detecção e quantificação do método analítico, o que pode ser confirmado pelos valores de LD e de LQ calculados para essa enzima.

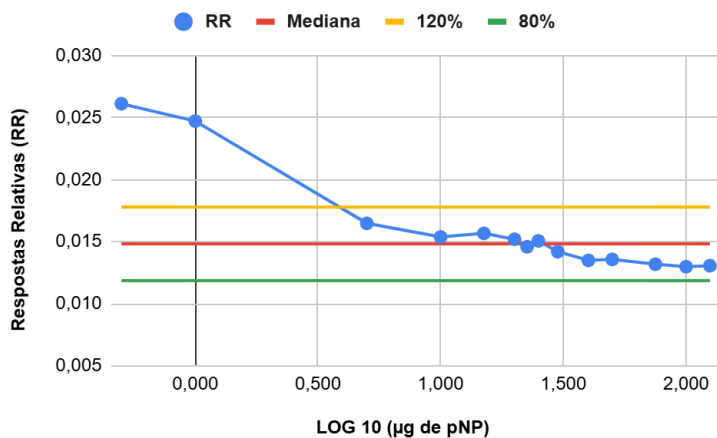


Figura 15: Faixa Linear a 400 nm

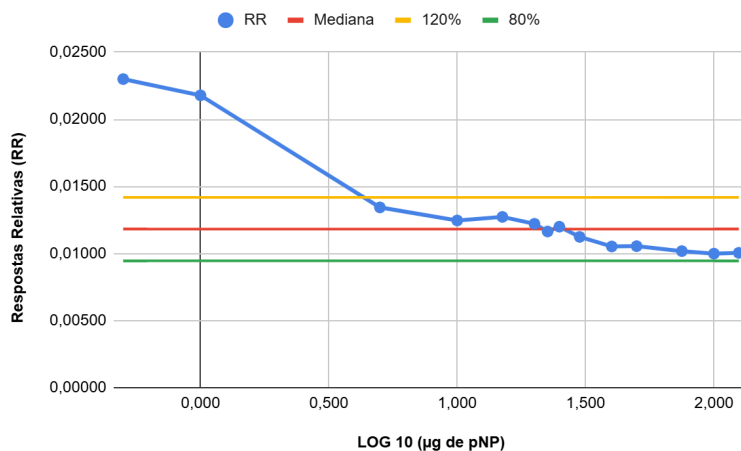


Figura 16: Faixa Linear a 420 nm

Em contrapartida, os demais pontos da curva, inclusive aqueles correspondentes às concentrações mais elevadas, mantiveram-se dentro da faixa linear dinâmica, atendendo aos critérios definidos para a faixa operacional em experimentos biológicos. Portanto, observa-se que, à medida que as concentrações aumentam, a resposta do método mantém-se linear, comprovando sua adequação para a quantificação da atividade da enzima β -glicosidase em uma ampla faixa de concentração. Sendo assim, o método validado apresenta uma faixa linear ampla e

confiável, adequada para quantificação precisa da β -glicosidase em matrizes ambientais, com a opção de ajuste da faixa conforme o nível de precisão desejado.

5.4.2. Faixa Linear Arilsulfatase

A avaliação da linearidade do método para a determinação da atividade da arilsulfatase foi realizada em dois comprimentos de onda distintos (400 nm e 420 nm), apresentando desempenho satisfatório em todas as condições testadas. Na condição de leitura a 400 nm, o método apresentou resposta linear consistente, com valores de recuperação relativa próximos à mediana e dentro dos critérios de aceitabilidade. Contudo, para essa faixa foram excluídos três pontos que apresentaram recuperação e precisão inadequadas, caracterizadas por desvios superiores aos limites estabelecidos, o que contribuiu para a consolidação de uma faixa linear robusta e confiável.

No comprimento de onda de 420 nm, embora tenha sido constatada linearidade aceitável, verificou-se uma ligeira diminuição na sensibilidade analítica em comparação às outras faixas. Três pontos foram excluídos por apresentarem recuperação relativa fora dos limites e CV elevado (maior que 10%), pois, para experimentos agrícolas, os coeficientes de variação (CV) são classificados como baixos quando inferiores a 10%, (Couto, 2013). Dessa forma, foi possível definir uma faixa linear estável e reproduzível após essas exclusões (Figuras 17 e 18).

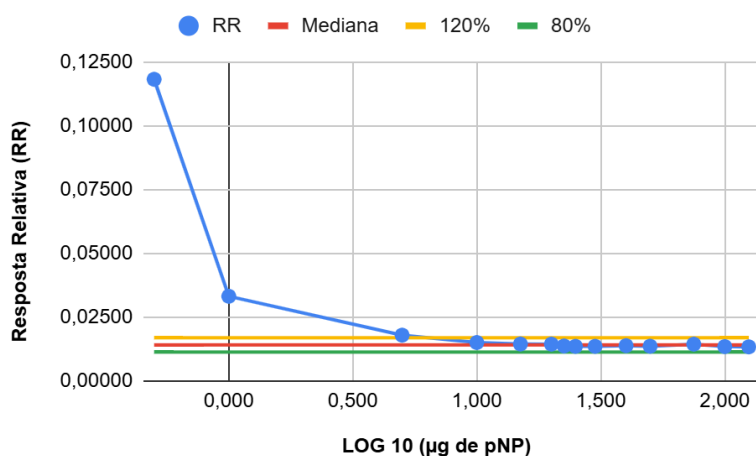


Figura 17: Faixa Linear a 400 nm

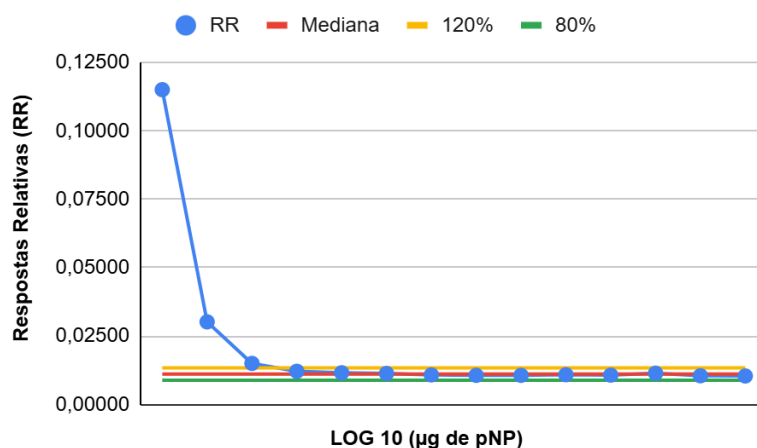


Figura 18: Faixa Linear a 420 nm

Portanto, de forma geral, os resultados indicam que o método apresenta linearidade satisfatória para a quantificação da atividade da arilsulfatase, especialmente em concentrações intermediárias a elevadas, estando dentro da faixa estabelecida pela Anvisa (80% a 120%). Destaca-se o desempenho superior observado no comprimento de onda de 400 nm, o qual demonstrou maior sensibilidade e estabilidade analítica, recomendando-se seu uso para análises precisas e confiáveis da atividade enzimática da arilsulfatase em amostras de solo.

5.5. Avaliação da estabilidade das soluções: pNG, pNS e pNP

Conforme o procedimento descrito na Seção 4.8.3, as leituras das absorbâncias foram realizadas em triplicata e por meio de varredura espectral na faixa de 350 a 500 nm, com o objetivo de identificar o comprimento de onda correspondente ao máximo de absorção de cada solução. Os valores de absorbância obtidos nas diferentes medições estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12- Dados da avaliação da estabilidade das soluções: pNG, pNS e pNP

| Dias | Reagentes | | | | | |
|------------|----------------------------|--------|----------------------------|--------|----------------------------|--------|
| | pNG (2,5 µg/L) | | pNS (2,5 µg/L) | | pNP (0,1 g/L) | |
| | <i>Abs_{média}</i> | DP | <i>Abs_{média}</i> | DP | <i>Abs_{média}</i> | DP |
| 10/10/2025 | 0,4211 | 0,0073 | 0,4030 | 0,0091 | 0,6562 | 0,0068 |
| 20/10/2025 | 0,4314 | 0,0073 | 0,4151 | 0,0086 | 0,6572 | 0,0063 |
| 30/10/2025 | 0,4411 | 0,0105 | 0,4145 | 0,0072 | 0,6591 | 0,0074 |
| 10/11/2025 | 0,4344 | 0,0116 | 0,4815 | 0,0080 | 0,6613 | 0,0053 |
| 20/11/2025 | 0,4358 | 0,0116 | 0,4195 | 0,0095 | 0,6634 | 0,0051 |
| 01/12/2025 | 0,4473 | 0,0115 | 0,4184 | 0,0078 | 0,6646 | 0,0065 |
| 11/12/2025 | 0,4590 | 0,0121 | 0,4197 | 0,0078 | 0,6663 | 0,0061 |
| 22/12/2025 | 0,4401 | 0,0115 | 0,4212 | 0,0082 | 0,6683 | 0,0072 |
| 05/01/2026 | 0,4715 | 0,0121 | 0,4222 | 0,0068 | 0,6912 | 0,0085 |
| 15/01/2026 | 0,4805 | 0,0132 | 0,4145 | 0,0061 | 0,6985 | 0,0075 |
| 26/01/2026 | 0,4863 | 0,0176 | 0,4261 | 0,0056 | 0,7103 | 0,0069 |
| 05/02/2026 | 0,4625 | 0,0179 | 0,4537 | 0,0061 | 0,7345 | 0,0063 |
| 12/02/2026 | 0,4842 | 0,0174 | 0,4652 | 0,0063 | 0,7451 | 0,0054 |

A estabilidade dos reagentes pNG, pNS e pNP foi avaliada ao longo do período de 10/10/2025 a 12/02/2026, com base nos valores médios de absorvância e nos respectivos desvios padrão obtidos em diferentes datas. A análise conjunta desses parâmetros permitiu verificar o comportamento temporal dos reagentes e a consistência das medições ao longo do tempo.

Para o substrato pNG, observou-se um aumento progressivo da absorvância média ao longo do período avaliado, passando de 0,4211 para 0,4842. Apesar de oscilações pontuais em algumas datas intermediárias, os valores de desvio padrão mantiveram-se baixos. Esse comportamento indica boa repetibilidade entre as réplicas e sugere que as variações observadas estão associadas predominantemente à variabilidade experimental, não sendo indicativas de degradação significativa do substrato nas condições de armazenamento adotadas.

No caso do pNS, os valores médios de absorvância apresentaram variação moderada ao longo do tempo. Os desvios padrão permaneceram baixos e homogêneos, o que evidencia baixa dispersão dos dados e adequada precisão analítica. O pNP apresentou o comportamento mais estável entre os três avaliados, caracterizado por um aumento gradual e aproximadamente linear da absorvância média, de 0,6562 para 0,7451 ao longo do período estudado. Destaca-se que os desvios padrão associados às medições do pNP foram consistentemente baixos, com valores

máximos de 0,0085, refletindo elevada reprodutibilidade entre as réplicas e alta precisão do método analítico. Esses resultados indicam elevada estabilidade desse reagente nas condições experimentais avaliadas, reforçando sua adequação para aplicações analíticas de rotina. A Figura 19 abaixo mostra a evolução das absorbâncias dessas espécies químicas ao longo do tempo.

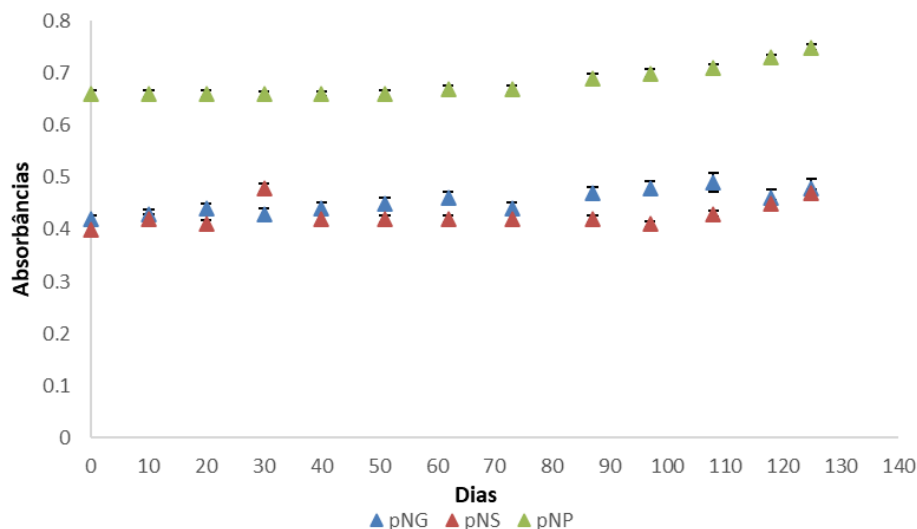


Figura 19: Gráfico de evolução das absorbâncias dos reagentes
Legenda: pNG (azul), pNS (vermelho) e pNP (verde)

A análise estatística de tendência para os dados de absorbância revelou comportamentos distintos entre os três reagentes ao longo dos 125 dias de experimento. O pNP destacou-se pela maior robustez e linearidade ($R^2=0,94$), com um incremento constante especialmente após o 60º dia. O pNG também apresentou uma trajetória de ascensão positiva nas primeiras medidas, embora com uma taxa de subida inferior à do pNP e uma maior dispersão dos dados, sugerindo um processo de evolução mais gradual e menos homogêneo. Em contrapartida, a amostra pNS exibiu um comportamento não previsível, influenciado por uma flutuação atípica no dia 30.

De modo geral, os resultados demonstram que, apesar dessas trajetórias particulares, os reagentes pNG, pNS e pNP mantiveram uma estabilidade global satisfatória. As variações registradas, mesmo nos pontos de maior dispersão ou flutuação, mostraram-se compatíveis (próximas à) com a incerteza experimental do equipamento ($\pm 0,005$ u.a.), validando a integridade dos materiais ao longo de todo o período analisado (Agilent Technologies, 2016).

5.6. Avaliação do tempo de secagem das amostras

5.6.1. Período de Estiagem: Setembro de 2025

A partir da Tabela 13 é possível perceber que durante o período compreendido entre o 2º e o 12º dia, verificou-se redução gradativa da taxa de perda de massa, associada à eliminação progressiva da água mais fortemente retida à matriz do solo. Nesse intervalo, a amostra proveniente do Parque Olhos d'Água apresentou a maior perda total de massa. Esse comportamento sugere maior teor inicial de umidade e/ou maior proporção de porosidade efetiva, favorecendo a liberação de água durante a estiagem, quando comparada às demais amostras (Bortoluzzi *et al.*, 2008).

A partir do 15º dia, observou-se inversão da tendência de variação de massa, com incremento progressivo dos valores, indicativo do início do processo de reabsorção de umidade. Esse fenômeno pode ser atribuído à capacidade higroscópica dos constituintes do solo, especialmente matéria orgânica e frações argilosas, que favorecem a adsorção de vapor d'água presente no ambiente (Lal, 2020). O aumento médio de massa a partir do 15º dia revela a sensibilidade das amostras às condições ambientais, mesmo após um período prolongado de secagem.

Entre o 19º e o 22º dia, as massas das amostras permaneceram praticamente constantes, com variações mínimas e desvios-padrão reduzidos, indicando o estabelecimento do equilíbrio higroscópico entre o solo e o ambiente. A baixa dispersão entre as réplicas ao longo de todo o experimento demonstra boa reprodutibilidade analítica e estabilidade do procedimento de pesagem, reforçando a confiabilidade dos resultados obtidos.

De forma comparativa, embora todas as amostras tenham apresentado um padrão semelhante de comportamento, conforme pode ser observado na Figura 20, a amostra do Parque Olhos d'Água destacou-se pela maior intensidade da perda de massa durante o período de estiagem. Esses resultados indicam diferenças nas propriedades físicas e composicionais dos solos avaliados, as quais podem influenciar diretamente a dinâmica da água no solo e, conseqüentemente, processos biogeoquímicos associados, como a atividade enzimática e a ciclagem de nutrientes.

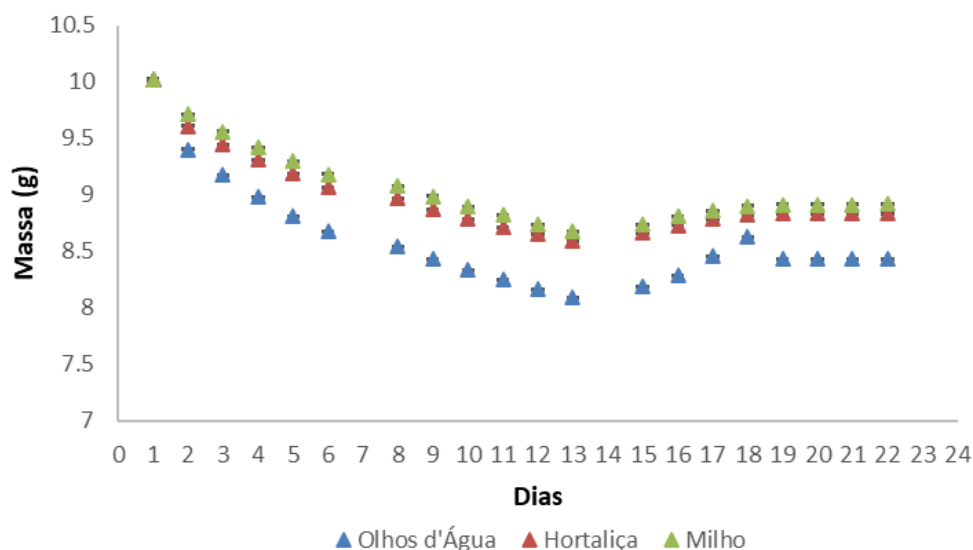


Figura 20: Gráfico de evolução da perda de água no período de estiação
 Legenda: Olhos D'água (azul), Hortaliça (vermelho) e Milho (verde)

Tabela 13- Massas das amostras de solo no período de seca durante 22 dias

| Dia | O_m | DP | H_m | DP | M_m | DP |
|-----|---------|--------|---------|--------|---------|--------|
| 1 | 10,0225 | 0,0026 | 10,0223 | 0,0017 | 10,0257 | 0,0030 |
| 2 | 9,4016 | 0,0032 | 9,6109 | 0,0021 | 9,7172 | 0,0033 |
| 3 | 9,1761 | 0,0031 | 9,4507 | 0,0020 | 9,5615 | 0,0032 |
| 4 | 8,9817 | 0,0030 | 9,3119 | 0,0020 | 9,4206 | 0,0031 |
| 5 | 8,8159 | 0,0029 | 9,1851 | 0,0019 | 9,2962 | 0,0035 |
| 6 | 8,6735 | 0,0028 | 9,0709 | 0,0019 | 9,1846 | 0,0026 |
| 8 | 8,5483 | 0,0021 | 8,9679 | 0,0019 | 9,0818 | 0,0019 |
| 9 | 8,4358 | 0,0025 | 8,8751 | 0,0021 | 8,9880 | 0,0023 |
| 10 | 8,3365 | 0,0023 | 8,7919 | 0,0023 | 8,9009 | 0,0027 |
| 11 | 8,2486 | 0,0029 | 8,7182 | 0,0015 | 8,8193 | 0,0029 |
| 12 | 8,1679 | 0,0023 | 8,6516 | 0,0017 | 8,7424 | 0,0023 |
| 13 | 8,0944 | 0,0026 | 8,5938 | 0,0018 | 8,6756 | 0,0028 |
| 15 | 8,1871 | 0,0025 | 8,6622 | 0,0018 | 8,7426 | 0,0029 |
| 16 | 8,2873 | 0,0029 | 8,7327 | 0,0024 | 8,8120 | 0,0032 |
| 17 | 8,4591 | 0,0026 | 8,7835 | 0,0026 | 8,8607 | 0,0024 |
| 18 | 8,6280 | 0,0022 | 8,8256 | 0,0022 | 8,9044 | 0,0031 |
| 19 | 8,4324 | 0,0023 | 8,8362 | 0,0019 | 8,9151 | 0,0025 |
| 20 | 8,4371 | 0,0021 | 8,8369 | 0,0016 | 8,9158 | 0,0019 |
| 21 | 8,4336 | 0,0019 | 8,8374 | 0,0022 | 8,9163 | 0,0038 |
| 22 | 8,4350 | 0,0028 | 8,8379 | 0,0015 | 8,9168 | 0,0035 |

Nesse contexto, embora a Embrapa recomende um período de 7 dias de secagem para a realização das análises, os dados obtidos no presente estudo indicam um comportamento distinto. Conforme observado na Figura 20, a estabilização dos parâmetros avaliados ocorre entre 13 e 14 dias de secagem. Assim, nas condições experimentais adotadas, esse intervalo mostra-se mais adequado para assegurar maior estabilidade e confiabilidade analítica das amostras, sugerindo a necessidade de reavaliação da recomendação para situações semelhantes às investigadas.

5.6.2. Período Chuvoso: Outubro de 2025

A partir dos dados abaixo, nota-se que no primeiro dia de monitoramento, observou-se maior variabilidade nas massas médias, associada ao estado inicial das amostras, ainda não submetidas a um equilíbrio higroscópico com o ambiente. A perda de umidade mais acentuada entre o 1º e o 2º dia indica a eliminação predominante de água livre e fracamente adsorvida, processo esperado nas etapas iniciais de secagem. Esse comportamento foi mais pronunciado nas amostras de Hortaliças e Milho, enquanto a amostra proveniente do Parque Olhos d'Água apresentou menor redução de massa, evidenciando maior capacidade de retenção hídrica.

Entre o 2º e o 8º dia, as três amostras exibiram redução progressiva da massa, o que sugere a transição do processo de secagem da remoção de água livre para a liberação de água mais fortemente retida nos poros do solo e associada à matriz mineral e orgânica. A partir do 10º dia, verificou-se um aumento da massa média em todas as amostras, caracterizando um evento de reabsorção de umidade, típico de condições de elevada umidade relativa do ar durante o período chuvoso. A ocorrência desse fenômeno de forma simultânea nas três amostras demonstra a forte influência das condições ambientais sobre a dinâmica hídrica das amostras.

Após o evento de reabsorção, entre o 10º e o 15º dia, as massas passaram a apresentar variações discretas e gradativas, sugerindo um processo de ajuste entre perda e ganho de umidade, tendendo ao equilíbrio higroscópico. A redução progressiva dos valores de desvio padrão ao longo desse período indica maior homogeneidade entre as réplicas e maior estabilidade do sistema experimental.

A partir do 17º dia, as amostras atingiram um regime de estabilidade, com flutuações de massa de baixa amplitude, compatíveis com oscilações naturais da umidade relativa do ambiente.

Esse comportamento demonstra o estabelecimento de um equilíbrio dinâmico entre o solo e a atmosfera, no qual processos de adsorção e dessorção de água ocorrem de forma compensatória.

De maneira geral, os resultados revelam que a amostra do Parque Olhos d'Água apresentou a menor perda total de umidade ao longo do período experimental, corroborando a hipótese de que solos com maior teor de matéria orgânica e estrutura mais agregada possuem maior capacidade de retenção hídrica (Lal, 2020). Além disso, essas amostras exibiram maior sensibilidade às variações ambientais, refletindo menor estabilidade hídrica nesse período, conforme pode ser observado na Tabela 14 e na Figura 21.

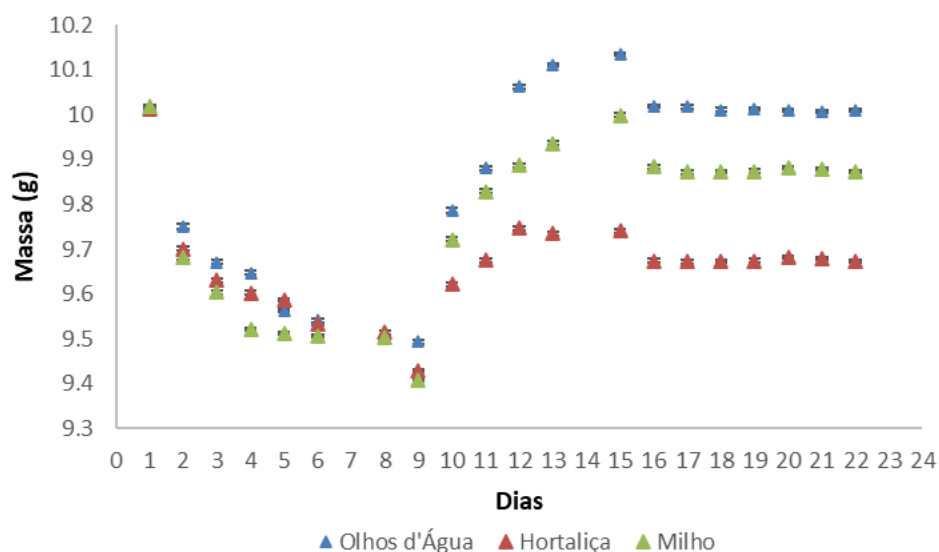


Figura 21: Gráfico da evolução da perda de água no período chuvoso.

Legenda: Olhos D'Água (azul), Hortaliça (vermelho), Milho (verde)

Tabela 14- Massas das amostras de solo no período chuvoso durante 22 dias

| Dia | O_m | DP | H_m | DP | M_m | DP |
|-----|---------|--------|---------|--------|---------|--------|
| 1 | 10,0126 | 0,0056 | 10,0139 | 0,0044 | 10,0187 | 0,0043 |
| 2 | 9,7508 | 0,0049 | 9,7012 | 0,0051 | 9,6824 | 0,0048 |
| 3 | 9,6709 | 0,0043 | 9,6305 | 0,0046 | 9,6041 | 0,0045 |
| 4 | 9,6474 | 0,0041 | 9,6029 | 0,0043 | 9,5216 | 0,0042 |
| 5 | 9,5626 | 0,0039 | 9,5867 | 0,0041 | 9,5128 | 0,0040 |
| 6 | 9,5415 | 0,0038 | 9,5334 | 0,0039 | 9,5065 | 0,0039 |
| 8 | 9,5053 | 0,0036 | 9,5146 | 0,0038 | 9,5037 | 0,0037 |
| 9 | 9,4931 | 0,0035 | 9,4282 | 0,0036 | 9,4089 | 0,0036 |
| 10 | 9,7864 | 0,0048 | 9,6216 | 0,0052 | 9,7216 | 0,0050 |
| 11 | 9,8812 | 0,0045 | 9,6758 | 0,0048 | 9,8289 | 0,0047 |
| 12 | 10,0622 | 0,0043 | 9,7463 | 0,0046 | 9,8863 | 0,0045 |
| 13 | 10,1113 | 0,0041 | 9,7357 | 0,0044 | 9,9357 | 0,0043 |
| 15 | 10,1355 | 0,0040 | 9,7414 | 0,0043 | 9,9984 | 0,0042 |
| 16 | 10,0194 | 0,0039 | 9,6736 | 0,0042 | 9,8836 | 0,0041 |
| 17 | 10,0176 | 0,0038 | 9,6719 | 0,0041 | 9,8719 | 0,0040 |
| 18 | 10,0111 | 0,0037 | 9,6731 | 0,0040 | 9,8731 | 0,0039 |
| 19 | 10,0122 | 0,0037 | 9,6742 | 0,0039 | 9,8742 | 0,0039 |
| 20 | 10,0089 | 0,0030 | 9,6818 | 0,0032 | 9,8818 | 0,0038 |
| 21 | 10,0076 | 0,0033 | 9,6787 | 0,0038 | 9,8787 | 0,0041 |
| 22 | 10,0113 | 0,0029 | 9,6729 | 0,0034 | 9,8729 | 0,0036 |

Considerando as oscilações significativas de massa observadas ao longo do experimento, especialmente o evento de reabsorção hídrica registrado a partir do 10º dia, recomenda-se a repetição do ensaio com mais amostras e sob condições ambientais mais controladas, a fim de aumentar a confiabilidade dos resultados. A condução do experimento durante o período chuvoso em Brasília possivelmente contribuiu para a variabilidade observada, em razão da elevada umidade relativa do ar, que favorece processos de adsorção e dessorção simultâneos e compromete a estabilização higroscópica das amostras.

Nesse contexto, sugere-se experimentos com secagem em estufa com circulação de ar a baixa temperatura (25–30 °C), faixa térmica suficiente para promover a remoção gradual da água livre e fracamente adsorvida, minimizando interferências ambientais e preservando as características físico-químicas e biológicas do solo (FAO, 2025). Tal procedimento permitiria

maior padronização das condições experimentais, redução da variabilidade entre réplicas e maior confiabilidade na comparação da dinâmica hídrica entre as diferentes áreas avaliadas.

6. CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu a validação e a otimização de métodos espectrofotométricos para a determinação da atividade das enzimas β -glicosidase e arilsulfatase em solos, abrangendo parâmetros analíticos fundamentais, como linearidade, limites de detecção e quantificação e comparação metodológica. A comparação entre os métodos de Calibração Externa e Adição de Padrão demonstrou que os dois métodos não forneceram resultados estatisticamente equivalentes, conforme o teste *t* de Student para comparação de duas médias independentes (95% de confiança).

Além disso, os resultados evidenciaram a diferença estatisticamente significativa entre os métodos avaliados ($t = 7,14$). Verificou-se tendência de subestimação das concentrações de pNP pelo método de Calibração Externa, em concordância com Silva e colaboradores (2025), atribuída ao efeito de matriz inerente às amostras de solo. A Calibração Externa pressupõe equivalência entre matriz das soluções padrão e das amostras, condição não plenamente atendida em sistemas complexos, o que pode comprometer a exatidão devido a interações analito–matriz, como processos de adsorção. Embora tenha sido observada forte correlação linear entre os métodos ($r = 0,9989$), é preciso empregar estratégias de correção, como a Adição de Padrão ou ensaios de recuperação, para assegurar maior confiabilidade metrológica nas determinações enzimáticas quando utilizado o método de Calibração Externa.

O comprimento de onda de 400 nm mostrou-se o mais adequado para a determinação do pNP nas análises de ambas as enzimas, assegurando maior sensibilidade e estabilidade analítica. Em situações de concentrações mais elevadas do analito, o comprimento de onda de 420 nm foi adotado para minimizar ruídos ópticos, proporcionando melhor definição do sinal. A avaliação da faixa linear indicou desempenho satisfatório para ambas as enzimas. Para a β -glicosidase, a faixa entre 5,0 e 125,0 μg apresentou elevada estabilidade e reprodutibilidade após a exclusão dos dois primeiros pontos da curva, os quais se situam abaixo do limite de detecção e apresentaram alta variabilidade.

De modo semelhante, a arilsulfatase apresentou melhor desempenho em concentrações intermediárias e elevadas, especialmente a 400 nm, com menores limites de detecção e quantificação, sendo necessária apenas a exclusão dos três primeiros pontos da curva analítica nos dois comprimentos de onda analisados (400 e 420 nm), apresentando faixa trabalho entre 10 e 125,0 μg . Conclui-se, portanto, que o método otimizado, baseado na Calibração Externa e na

leitura a 400 nm, apresenta elevada sensibilidade, precisão e linearidade, sendo eficaz para a quantificação da atividade da β -glicosidase e da arilsulfatase em solos, com a leitura a 420 nm recomendada em condições de maior concentração de analito.

Acrescenta-se que, é fundamental atentar-se à construção das curvas analíticas empregadas na quantificação enzimática, pois, do ponto de vista da análise instrumental, não se deve assumir que a reta de calibração passe, necessariamente, pela origem (0,0), pois a regressão linear deve ser estabelecida com base nos dados experimentais obtidos, sem forçar a interceptação no zero, já que a presença de sinal de branco, ruído instrumental, desvios sistemáticos e contribuições da matriz podem resultar em intercepto diferente de zero. A imposição artificial da passagem pela origem pode introduzir erro sistemático e comprometer a exatidão das concentrações calculadas, especialmente em faixas de baixa concentração, nas quais há um aumento das incertezas (Skoog, 2006).

Em relação à avaliação da estabilidade das soluções de pNG, pNS e pNP ao longo dos 125 dias de análises, os resultados demonstraram que os três compostos apresentaram comportamento analítico satisfatório e adequado às condições de armazenamento adotadas. O pNP destacou-se por exibir elevada reprodutibilidade e mínima dispersão dos dados, enquanto o pNS e o pNG, embora tenham apresentado flutuações mais pronunciadas, não mostraram indícios de degradação química significativa ao longo do tempo. Dessa forma, os resultados demonstraram a confiabilidade das soluções para aplicações analíticas de rotina e estudos de atividade enzimática, evidenciando a robustez do método. Verificou-se também que o tempo de secagem das amostras de solo depende tanto das características intrínsecas quanto das condições ambientais: durante a estiagem, a perda de massa foi gradual até o equilíbrio higroscópico, enquanto no período chuvoso a reabsorção de umidade ocorreu de forma mais precoce.

Diante do conjunto de resultados obtidos, conclui-se que os métodos espectrofotométricos utilizados neste estudo foram validados analiticamente, atendendo aos principais critérios de validação, como linearidade, precisão, sensibilidade, limites de detecção e quantificação e estabilidade das soluções. Além disso, a estabilidade comprovada dos reagentes e o controle do tempo de secagem das amostras reforçam a robustez metodológica e a reprodutibilidade analítica do procedimento proposto. Dessa forma, o método apresenta aplicabilidade segura em análises de rotina e em estudos ambientais e agrônômicos, contribuindo de maneira consistente para a avaliação da qualidade bioquímica do solo.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA-MARTÍNEZ, V.; CRUZ, L.; SOTOMAYOR-RAMÍREZ, D.; PÉREZ-ALEGRÍA, L. Enzyme activities as affected by soil properties and land use in a semiarid region. *Applied Soil Ecology*, v. 35, n. 3, p. 300–310, 2007.
- ACOSTA-MARTÍNEZ, V., PÉREZ-GUZMÁN, L., VEUM, K. S., NUNES, M. R. & DICK, R. P. Metabolic Activity – Enzymes. In: D.L. Karlen, D. E. Stott; M. M. Mikha, eds. *Laboratory Methods for Soil Health Analysis*. Soil Health series Volume 2, p. 194–250, 2021.
- ACOSTA-MARTÍNEZ, V.; ZOBECK, T. M. Enzyme activities and arylsulfatase, and nutrient and organic carbon content in aggregates of sandy soils. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 36, n. 4, p. 601–606, 2004.
- ADETUNJI, A. T.; LEWU, F. B.; MULIDZI, R.; NCUBE, B. The biological activities of β -glucosidase, phosphatase and urease as soil quality indicators: a review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, v. 17, n. 3, p. 794-807, 2017.
- AGILENT TECHNOLOGIES. Agilent Cary 8454 UV-Visible Spectrophotometer: specifications., 2016. Disponível em: https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/UV-Vis_cary_8454_5991-4282EN_whitepaper.pdf?srltid=AfmBOop_wOWAKTqxrJiMEpvqfJJ_muy-7jvP4gcEMFqQ-a3tPEokN_K8X. Acessado em: 15 de fevereiro de 2026.
- AHMED, A.; NASIM, F. U.; BATOOL, K.; BIBI, A. Microbial β -glucosidase: sources, production and applications. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, v. 5, n. 1, p. 31-46, 2017.
- ALOVISI, A. A. Indicadores de qualidade do solo, acúmulo de carbono e características agronômicas da soja em sistemas de manejo de longa duração. 2023. Tese de doutorado, UFGD, Dourados, MS, 2023.
- BALDONI D. B., ANTONIOLLI Z. I., MAZUTTI M. A., JACQUES R. J. S., DOTTO A. C., SILVEIRA A. O., FERRAZ R. C., SOARES V. B., SOUZA A. R. C. Chitinase production by *Trichoderma koningiopsis* UFSMQ40 using solid state fermentation. *Brazilian J Microbiol.* v. 51, p.1897-908, 2020.
- BARNETT, B. J.; INGRAM, M.; SWAIN, T. The use of β -glucosides in classifying yeasts. *Journal of General Microbiology*, v. 15, p. 553–561, 1956.
- BARROS NETO, B. D.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria. 4. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2010.
- BORTOLUZZI, E. C.; RHEINHEIMER, D. S.; KAMINSKI, J.; GATIBONI, L. C.; TIECHER, T. L. Porosidade e retenção de água em um Argissolo sob manejos convencional e direto submetido

a compressões unidimensionais. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 32, n. 2, p. 629–638, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. DOU seção 1, Brasília, DF, n. 141, p. 45-49, 2017. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/20134793. Acessado em: 30 junho de 2025.

BREMNER, J. M.; TABATABAI, M. A. Use of p-nitrophenyl phosphatase for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 1, n. 4, p. 301-307, 1969.

BRENDA. B – The Comprehensive Enzyme Information System. Entry: EC 3.1.6.1 – Arylsulfatase. Disponível em: <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.1.6.1>. Acessado em: 18 de janeiro de 2026.

BURNS R. G. Enzyme activity in soil: some theoretical and practical considerations. In: Burns RG (ed) *Soil Enzymes*. Academic Press, London, p. 295–340, 1978.

CARNEIRO, R. G.; MENDES, I. C.; CHAER, G. M.; REIS JUNIOR, F. B.; FERNANDES, M. F.; SOUZA, R. C.; HUNGRIA, M. A soil health assessment tool for vegetable cropping systems in tropical soils based on beta-glucosidase, arylsulfatase, and soil organic carbon. *Applied Soil Ecology*, v. 198, 2024.

CASTELLANO, S. D.; DICK, R. P. Cropping and sulfur fertilization influence on sulfur transformations in soil. *Soil Science Society of America Journal*, v. 54, p. 114–121, 1990.

COUTO, M. F.; PETERNELLI, L. A.; BARBOSA, M. H. P. Classification of the coefficients of variation for sugarcane crops. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 43, nº6, p.957-961, 2013. ISSN 0103-8478.

DATTA, R. Enzymatic degradation of cellulose in soil: a review. *Heliyon*, v. 10, n. 1, 2024.

DENG, S.; POPOVA, I. Carbohydrate hydrolases. In: Dick, R. P. *Methods of soil enzymology*. Madison: Wiley, p. 185–209, 2015.

EIVAZI, F.; TABATABAI, M. A. Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 20, n. 5, p. 601–606, 1988.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Manual de métodos de análise de solo. 3. ed., Brasília, 2017. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1085209/manual-de-metodos-de-analise-de-solo>. Acessado em: 12 de fevereiro de 2026.

ERKANLI, M. E.; EL-HALABI, K.; KIM, J. R. Exploring the diversity of β -glucosidase: Classification, catalytic mechanism, molecular characteristics, kinetic models, and applications., *Enzyme and Microbial Technology*, v. 173, 2024.

EVANGELISTA, C. R.; PARTELLI, F. L.; BRITO FERREIRA, E. P.; CORRECHEL, V. Atividade enzimática do solo sob sistema de produção orgânica e convencional na cultura da cana-de-açúcar em Goiás. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 33, n. 4, p. 1251–1261, 2012.

FANIN, N.; GARCÍA-PALACIOS, P.; FROMIN, N.; OBERSON, A.; HÄTTENSCHWILER, S. Soil enzymes in response to climate warming: Mechanisms and feedbacks. *Functional Ecology*, v. 36, n. 6, p. 1378–1395, 2022.

FIGUEIREDO, J. P.; ISLABÃO, L. O.; HAUDT, I. W.; FARIAS, E. M.; RAMSON, C. de M.; STUMPF, L. Enzima β -glicosidase e sua relação com o teor de matéria orgânica em agroecossistemas familiares voltados para a produção de hortaliças. In: ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO (ENPÓS), 2023. Disponível em: <http://guaiaca.ufpel.edu.br/xmlui/handle/prefix/12558>. Acessado em: 12 fevereiro de 2026.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Keep soil alive, protect soil biodiversity – Global Symposium on Soil Biodiversity. Proceedings, 2021. Disponível em: <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/281ad631-9444-4d9a-9553-898be5a49399/content>. Acessado em: 12 de fevereiro de 2026.

GERMIDA, J. J.; WAINWRIGHT, M.; GUPTA, V. V. S. R. Biochemistry of sulfur cycling in soil. In: STEVENSON, F. J. (Ed.). *Soil Biochemistry*. 1. ed, p. 1–53, 1991.

GIL-SOTRES, F.; TRASAR-CEPEDA, C.; LEIRÓS, M. C.; SEOANE, S. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 37, n. 5, p. 877–887, 2005.

HANEKLAUS, S.; BLOEM, E.; SCHNUG, E. Sulfur interactions in crop ecosystems. In: HAWKESFORD, M. J.; DE KOK, L. J. (Eds.). *Sulfur in plants: an ecological perspective*. [S.l.]: Springer. p. 17–58, 2007.

HARRIS, D. C. *Quantitative Chemical Analysis*. 9. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2015.

HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. *Bioquímica ilustrada de Harper*. 31. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.

HAYANO, K. A method for the determination of β -glucosidase activity in soil. *Soil Science and Plant Nutrition*, v. 19, p. 103-108, 1973.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). *Enzymes*. In: *Compendium of Chemical Terminology*. 5. ed. International Union of Pure and Applied Chemistry, 2025. Online version 5.0.0, 2025

KARIGAR, Chandrakant S.; RAO, Shwetha S. Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review. *Enzyme research*, v. 2011, n. 1, 2011.

- KLOSE, S.; BILEN, S.; TABATABAI, M.; DICK, W. Sulfur cycle enzymes. In: DICK, R. P. (Ed.). *Methods of soil enzymology*. Soil Science Society of America, p. 125-151, 2011.
- KLOSE, S.; TABATABAI, M. A. Arylsulfatase activity of microbial biomass in soils. *Soil Science Society of America Journal*, v. 63, p. 569–574, 1999.
- KUNITO, T.; KURITA, H.; KUMORI, M.; SAKAGUCHI, K.; NISHIZAWA, S.; FUJITA, K.; MORO, H.; SAWADA, K.; MIYABARA, Y.; TODA, H.; NAGAOKA, K.; ISHIKAWA, Y. Microbial synthesis of arylsulfatase depends on the soluble and adsorbed sulfate concentration in soils. *European Journal of Soil Biology*, v. 111, p. 103705, 2022.
- LAL, R. Soil organic matter and water retention. *Agronomy Journal*, v. 112, n. 5, p. 3265–3277, 2020.
- MALCOLM, R. E. Assessment of Phosphatase activity in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 15, n. 4, p. 403-408, 1983.
- MARGENOT, A. J.; NAKAYAMA, Y.; PARIKH, S. J. Methodological recommendations for optimizing assays of enzyme activities in soil samples. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 125, p. 350-360, 2018.
- MARSONA, B. M.; CONCENTINO, V.; JUNKERTA, A. M.; FACHIA, M. M.; VILHENA; PONTAROLO, R. Validation of analytical methods in a pharmaceutical quality system: an overview focused on HPLC methods. *Quim. Nova*, v. 43, n. 8, p. 1190-1203, 2020.
- MARX, M. C.; WOOD, M.; JARVIS, S. C. A microplate fluorimetric assay for the study of enzyme activities in samples from different environments. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v. 33, n. 12, p. 1633-1640, 2001.
- MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. *Bioquímica básica*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.
- MARTINS, C. M.. Implementação e validação do método para a determinação da atividade da enzima arilsulfatase em solos. 2025. Trabalho de Conclusão de Curso, UnB, Brasília, 2025.
- MATOS, D. M., SANTOS, E. F., & MOREIRA, F. M. Capacidade de troca catiônica e sua relação com a microbiota do solo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 56, n. 4, p. 201-214, 2021.
- MATSUOKA, M.; MENDES, I. D. C.; LOUREIRO, M. D. F. Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos de Cerrado e sistemas agrícolas anuais e perenes na região de Primavera do Leste/MT. *Embrapa Cerrados. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, v. 34, 2002.
- MENDES, I. D. C. Standard operating procedure for soil enzyme activities – β -glucosidases, arylsulfatase, N-acetyl- β -glucosaminidase, dehydrogenase, phosphomonoesterases. *Food & Agriculture Org.*, 2025. Disponível em:

https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=j0VNEQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=MENDES,+I.+D.+C..+2025.+Standard+operating+procedure+for+soil+enzyme+activities+%E2%80%93+glucosidases,+arylsulfatase,+N-acetyl-%CE%B2-glucosaminidase,+dehydrogenase,+phosphomonoesterases.+Rome,+FAO.+&ots=7-LjqYrP4&sig=RLjMhoG2p63A7AtWcaP62GFWeXO&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false. Acessado em 12 de fevereiro de 2026.

MENDES, I. C.; SOUSA, D. M. G.; REIS JUNIOR, F. B.; LOPES, A. A. C. Circular técnica 38: bioanálise de solo: como acessar e interpretar a saúde do solo. Planaltina, DF: Embrapa, 2018. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1110832/1/CircTec38IedaMendes.pdf>. Acessado em: 12 de fevereiro de 2026.

METTLER TOLEDO. UV/Vis spectrophotometry: fundamentals and applications. Version 04/2023. Greifensee: Mettler-Toledo AG, 2023. Disponível em: <[https://www.mt.com/dam/MT-MX/UVVIS_Spectrophoto_Guide_EN_30256131C_V08.21_Original_69649%20\(1\).pdf](https://www.mt.com/dam/MT-MX/UVVIS_Spectrophoto_Guide_EN_30256131C_V08.21_Original_69649%20(1).pdf)>. Acessado em: 17 de novembro de 2025.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C. Statistics and chemometrics for analytical chemistry. 6. ed. Harlow: Pearson Education, 2010.

MINASNY, B.; MALONE, B. P.; McBRATNEY, A. B.; ANGERS, D. A.; ARROUAYS, D.; CHAMBERS, A.; CHENU, C.; FIORENTINO, G.; RICCIUTO, D. M.; ROMANYA, J.; SLEUTEL, S.; SMITH, P.; WINOWIECKI, L. A. Soil carbon 4 per mille. *Geoderma*, v. 292, p. 59–86, 2017.

MÓL, P. C. G.; JÚNIOR, J. C. Q.; VERÍSSIMO, L. A. A.; BOSCOLO, M.; GOMES, E.; MINIM, L. A.; DA SILVA, R. β -glucosidase: an overview on immobilization and some aspects of structure, function, applications and cost. *Process Biochemistry*, v. 130, p. 26–39, 2023.

MOON, D. H.; OK, Y. S. Assessment of Soil Health in Urban Agriculture: Soil Enzymes and Microbial Properties. *Sustainability*, v. 9, n. 310, 2017.

NANNIPIERI, P.; SASTRE, I.; LANDI, L.; LOBO, M. C.; PIETRAMELLARA, G. Determination of extracellular neutral phosphomonoesterase activity in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 28, n. 1, p. 107–112, 1996.

NANNIPIERI, P.; TRASAR-CEPEDA, C.; DICK, R. P. Soil enzyme activity: a brief history and biochemistry as a basis for appropriate interpretations and metaanalysis. *Biology and Fertility of Soils*, v. 54, n. 1, p. 11–19, 2018.

OLIVEIRA, A. S. D. Glomalina e enzimas em solo de áreas de uso de forrageiro no bioma Caatinga. 2022. Dissertação de mestrado, UFRPE, Recife, 2022.

PACHECO, T. F.; MENDES, T. D. Guia prático para caracterização de enzimas. Embrapa Agroenergia, 2021. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1131161/1/Guia-pra769tico-para-a-caracterizac807a771o-de-enzimas.pdf>. Acessado em: 12 de fevereiro de 2026.

- PASSINATO, J. H.; AMADO, T. J. C.; KASSAM, A.; ACOSTA, J. A. A.; AMARAL, L. DE P. Soil health check-up of conservation agriculture farming systems in Brazil. *Agronomy*, v. 11, n. 12, p. 2410, 2021.
- PASSOS, S. R.; JUNIOR, F. B. D. R.; RUMJANEK, N. G.; MENDES, I. D. C.; BAPTISTA, M. J.; XAVIER, G. R. Atividade enzimática e perfil da comunidade bacteriana em solo submetido à solarização e biofumigação. *Pesq. agropec. Brasília*, v. 43, n. 7, p. 879-885, 2008.
- PAWLOWSKI, E. Atividade das enzimas β -glicosidase e arilsulfatase em solo arenoso de vinhedo no bioma Pampa. Dissertação de mestrado, UFSM, RS, 2024.
- PAZUTTI, L. B.; CHAER, G. M. Otimização de métodos para análise de fosfatase e arilsulfatase em solos. *Anais da Semana Científica Johanna Döbereiner*, 2013. Disponível em: <https://seer-cnpab.nuvem.ti.embrapa.br/ojscnpab/index.php/scjd/article/view/1789>. Acessado em: 12 de fevereiro de 2026.
- PEREIRA, V. L.; ROCHA, G. F.; ANDRADE, D. S. Uso de fertilizantes e pesticidas e seus efeitos na atividade biológica do solo. *Scientia Agricola*, v. 73, n. 2, p. 113-120, 2016.
- PERINAZZO, Bianca Silva. Implementação e validação do método para a determinação da atividade da enzima β -glicosidase em solos. 2025. Trabalho de Conclusão de Curso, UnB, Brasília, 2025.
- QUAGGIO, J. A.; CANTARELLA, H. (org.). Protocolo IAC: Determinação da atividade de enzimas em solos. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 2022. 5 p. Disponível em: <https://lab.iac.sp.gov.br/Publicacao/ProtocoloIACEnzimasSolosAbril2022.pdf>. Acesso em: 18 jan. 2026.
- REIS, M. P.; GOMES, C. L.; NUNES, J. O. Matéria orgânica e sua influência na atividade de enzimas do solo. *Revista de Ecologia e Biologia do Solo*, v. 38, p. 47-59, 2020
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, Iolanda C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- SCHERER, H. W. Sulphur in crop production. *European Journal of Agronomy*, v. 14, p. 81-111, 2001.
- SCHNEIDER, K.; TURRIÓN, M. B.; GALLARDO, J-F. Modified method for measuring acid phosphatase activities in forest soils with high organic matter content. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v. 31, n. 19-20, p. 3077-3088, 2000.
- SILVA, A. B. D; KASCHUK, G. Soil matrix affects the determination of p-nitrophenol and the estimation of β -glucosidase, arylsulfatase, and acid phosphatase activities in subtropical soils. *Pedobiologia - Journal of Soil Ecology*, v. 110, 2025.

SILVA, J. P.; SOUZA, M. R. Atividade enzimática no solo: revisão crítica. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 44, p. 1-12, 2020.

SILVA, R. C.; FERNANDES, L. P., TEIXEIRA, T. A. Efeito do pH na atividade enzimática do solo em diferentes sistemas de manejo. *Revista Brasileira de Agroecologia*, v. 14, n. 2, p. 75-89, 2019.

SILVEIRA, A. P. D.; CARDOSO, E. J. B. N.; MONTEIRO, R. T. R.; ANDRADE, C. A.; ABREU, C. A.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; RAIJ, B. van. Determinação da atividade de enzimas em solos. Instituto Agronômico, Campinas. Manual de métodos de análise de solo, p. 3-13, 2021.

SINSABAUGH, R. L.; LAUBER, C. L.; WEINTRAUB, M. N.; AHMED, B.; ALLISON, S. D.; CRANDALL, M. S.; CONTINENTINO, M. D.; CUSACK, D.; FREY, S.; GALLO, M. E.; GARTNER, T. B.; HOBBIE, S. E.; HOLLAND, K.; KEELER, B. L.; POWERS, J. S.; STURSOVA, M.; TAKACS-VESBACH, C.; WALDROP, M. P.; WALLENSTEIN, M. D.; ZAK, D. R.; ZEGRE, N. Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. *Ecology Letters*, v. 11, n. 11, p. 1252-1264, 2008.

SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH, *Fundamentos de Química Analítica*, Tradução da 8ª Edição norte-americana, Editora Thomson, São Paulo-SP, 2006.

SOBUCKI, L.; RAMOS, R. F.; MEIRELES, L. A.; ANTONIOLLI, Z. I.; JACQUES, R. J. S. Contribution of enzymes to soil quality and the evolution of research in Brazil. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 45, 2021.

SOUZA, E. M., CARDOSO, P. A., & RIBEIRO, F. J. Saturação por bases e alumínio e sua correlação com a atividade enzimática do solo. *Pesquisa em Ciência do Solo*, v. 33, n. 3, p. 98-112, 2018.

SPEIR, T. W. Studies on arylsulphatase activity of soils. *New Zealand Journal of Science*, v. 20, n. 1, p. 125-132, 1977.

STRESSLER, T.; SEITL, I.; KUHN, A.; FISCHER, L. Detection, production, and application of microbial arylsulfatases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Springer Verlag, v. 100, n. 21, p. 9053-9067, 2016.

TABATABAI, M. A. Soil enzymes. *Methods of soil analysis: Part 2 Microbiological and biochemical properties*, v. 5, p. 775-833, 1994.

TABATABAI, M. A.; BREMNER, J. M. Arylsulfatase activity of soils. *Soil Science Society of America Journal*, v. 34, n. 2, p. 225-229, 1970.

UWITUZE, Y.; NYIRANEZA, J.; FRASER, T. D.; DESSUREAUT-ROMPRÉ, J.; ZIADI, N.; LAFOND, J. Carbon, nitrogen, phosphorus, and extracellular soil enzyme responses to different land use. *Frontiers in Soil Science*, v. 2, 2022.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. *Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular*. 4. ed., Artmed, 2015.

**DECLARAÇÃO DE ORIGINALIDADE DE DISSERTAÇÃO DE Mestrado OU TESE DE
DOUTORADO**

Declaro que a presente dissertação/tese é original, elaborada especialmente para este fim, não tendo sido apresentada para obtenção de qualquer título e que identifico e cito devidamente todas as autoras e todos os autores que contribuíram para o trabalho, bem como as contribuições oriundas de outras publicações de minha autoria.

Declaro estar ciente de que a cópia ou o plágio podem gerar responsabilidade civil, criminal e disciplinar, consistindo em grave violação à ética acadêmica.

Brasília, 10 de março de 2026.

Assinatura do/a discente:

Programa: Programa de Pós-Graduação em Química

Nome completo: Larizza Marianne Frota Feitosa

Título do Trabalho: Validação Analítica Do Método De Quantificação Espectrofotométrica De B-Glicosidase E Arilsulfatase Em Solos

Nível: Mestrado Doutorado

Orientador/a: Fernanda Vasconcelos de Almeida