

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA

BIANCA SILVA PERINAZZO

IMPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA β-GLICOSIDASE EM SOLOS.

BRASÍLIA

2025

BIANCA SILVA PERINAZZO

IMPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA β-GLICOSIDASE EM SOLOS.

Trabalho apresentado à Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro, como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Química Tecnológica.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Vasconcelos de Almeida

BRASÍLIA

2025

AGRADECIMENTOS

A caminhada para a formação acadêmica foi longa e não teria sido possível sem o apoio de todos aqueles que estiveram ao meu lado ao longo desse percurso.

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por iluminar meus caminhos e me guiar durante toda essa jornada.

À minha família, minha eterna gratidão: à Lúcia de Fátima Silva Perinazzo, uma mãe amorosa que, com tanta dedicação, acordava todos os dias às quatro da manhã para que eu pudesse continuar meus estudos; ao meu pai, Aldair Perinazzo e ao meu irmão, Mateus Silva Perinazzo, por me apoiarem e oferecerem a base necessária para seguir em frente.

À Professora Dra. Fernanda Vasconcelos de Almeida, minha sincera admiração e agradecimento por ter me acolhido em suas pesquisas e projetos, por toda orientação, ensinamentos e profissionalismo. Sua disponibilidade e excelência foram fundamentais para minha graduação.

Às queridas Catarina Medeiros Martins e a Laura Botelho Bomfim, minhas parceiras de curso desde o primeiro semestre: obrigada por cada momento compartilhado. Sem vocês, essa trajetória não teria sido a mesma. Sou eternamente grata por tê-las em minha vida.

Aos amigos que me apoiaram, ajudaram e permaneceram ao meu lado nos momentos bons e ruins, minha gratidão por cada gesto de carinho, incentivo e companhia. E, especialmente, aos meus amigos de ônibus OdoTur (Veteranos e Werneck), que durante todos os anos de graduação dividiram comigo o café da manhã, reservaram meu lugar e trouxeram leveza mesmo nos dias mais difíceis, seja sob sol, chuva ou no meio da estrada com o ônibus quebrado. Obrigada pela companhia, pelas risadas e pela força para enfrentar as adversidades.

Aos estagiários e servidores da ANP, muito obrigada por contribuírem para o meu aprendizado e por me ajudarem a crescer profissionalmente.

Ao corpo docente do Instituto de Química e à Universidade de Brasília, pelas contribuições a minha formação. E a todos do AQQUA, que me acompanharam no laboratório no dia a dia e compartilharam comigo conhecimento e experiências valiosas: meu muito obrigada.

Enfim, sou profundamente grata a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha formação e para o meu crescimento pessoal e profissional.

RESUMO

A enzima β-glicosidase é responsável pela última etapa da degradação da celulose, catalisando a reação que libera glicose no solo. Assim, está diretamente relacionada com a ciclagem do carbono e degradação de matéria orgânica, o que a torna um bioindicador sensível para a avaliação de qualidade e saúde do solo. A determinação da atividade enzimática da β-glicosidase tornou-se amplamente usada no âmbito agronômico, seguindo a metodologia estabelecida por Tabatabai em 1994. O método quantifica indiretamente a atividade da enzima, através da determinação de espectro colorimétrica do *p*-nitrofenol (*p*NP) liberado pela quebra da ligação glicosídica presente no substrato *p*-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (PNG), catalisada pela β-glicosidase. Dessa maneira, o presente estudo tem como objetivo aprofundar a compreensão sobre a enzima β-glicosidase em um ponto de vista químico, como também, realizar a validação preliminar do seu método de análise, determinando seus limites analíticos. Para isso, fez-se um levantamento bibliográfico sobre a metodologia, traçou-se uma linha temporal desde seu surgimento à sua aplicação atual pela Embrapa. Além disso, foi realizada a validação do método seguindo a Resolução nº166/2017 da Anvisa. Determinou-se a linearidade, o limite de detecção (LD), o limite de quantificação (LQ) e a homocedasticidade da curva analítica do *p*NP. A validação mostrou que o método apresenta uma alta linearidade (R^2 = 0,999) em uma ampla faixa de massas de *p*NP (0,5 a 125 µg), sendo homocedástica. A faixa de linearidade dinâmica e o coeficiente de variação (CV) indicaram que os dois pontos de menores massas apresentavam-se com baixa reprodutividade, portanto fora dos limites de quantificação. Portanto, os limites calculados seguindo a resolução da Anvisa apresentaram valores de LD = 3,83 µg e LQ = 11,62 µg, para o comprimento de onda de 400 nm e LD = 4,40 µg e LQ 13,35 µg para 415 nm. Realizou-se, assim, uma validação preliminar da curva analítica, com a finalidade de viabilizar estudos posteriores.

Palavras-chaves: β-glicosidase, validação, solos.

ABSTRACT

The β-glucosidase is responsible for the final step of cellulose degradation, catalyzing the reaction that releases glucose into the soil. Thus, it is directly related to carbon cycling and organic matter degradation, making it a sensitive bioindicator for assessing soil quality and health. The determination of β-glucosidase activity has been widely used in agronomy, based on the methodology established by Tabatabai (1994). This method indirectly quantifies enzyme activity through the colorimetric spectrophotometric determination of *p*-nitrophenol (*p*NP), released by the cleavage of the glycosidic bond in the substrate *p*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (PNG), catalyzed by β-glucosidase. This study aimed to advance the understanding of β-glucosidase from a chemical perspective and to perform a preliminary validation of its analytical method, establishing analytical limits. A literature review was conducted to outline the methodological evolution, from its origin to its current application by Embrapa. Additionally, the method was validated according to Anvisa Resolution No. 166/2017, assessing linearity, limit of detection (LD), limit of quantification (LQ), and homoscedasticity of the *p*NP analytical curve. Validation demonstrated high linearity (R^2 = 0.999) over a wide range of *p*NP masses (0.5–125 µg), with homoscedastic behavior. The dynamic linearity range and coefficient of variation (CV) revealed low reproducibility for the two lowest mass points, placing them outside the quantification limits. Accordingly, the limits calculated following Anvisa guidelines were LD = 3.83 µg and LQ = 11.62 µg at 400 nm, and LD = 4.40 µg and LQ = 13.35 µg at 415 nm. Therefore, a preliminary validation of the analytical curve was conducted, providing support for further studies.

Keywords: β-glucosidase, validation, soil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Conversão da glicose da forma linear para a forma cíclica. O grupo aldeído do carbono 1 reage com o grupo hidroxila do carbono 5, formando um hemiacetal cíclico de seis membros, que pode existir como dois isômeros: α e β 6

Figura 2 - Formação de ligação glicosídica com configuração α 7

Figura 3 - Estruturas dos dissacarídeos mais comuns com conformações α e β 8

Figura 4 - Enzimas β-Glicosidase 8

Figura 5 - Degradação da celulose 10

Figura 6 - Hidrólise do PNG catalisado pela β-glicosidase 13

Figura 7 - Absorbância do p-nitrofenol 18

Figura 8 - Procedimento de preparo de amostra 25

Figura 9 - Absorbância das massas de 0,5 µg a 125,0 µg 28

Figura 10 - Gráfico de Absorbância versus massa de pNP a 400 nm 31

Figura 11 - Gráfico de Absorbância versus massa de pNP a 415 nm 31

Figura 12 - Faixa Linear Dinâmica a 400 nm 32

Figura 13 - Faixa Linear Dinâmica a 415 nm 32

Figura 14 - pNP de 0,5 µg 33

Figura 15 - pNP de 1,0 µg 34

Figura 16 - pNP de 5,0 µg 34

Figura 17 - Gráfico de dispersão de resíduos a 400 nm 37

Figura 18 - Gráfico de dispersão de resíduos a 415 nm 37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Volumes de padrão e reagentes para o preparo da curva analítica da β-glicosidase 23

Tabela 2 - Valores de absorbância média para 400 nm, seus desvios padrão, coeficiente de variação e intervalo de confiança para os pontos da curva analítica 29

Tabela 3 - Valores de absorbância média para 415 nm, seus desvios padrão, coeficiente de variação e intervalo de confiança para os pontos da curva analítica 29

Tabela 4 - Valores para a faixa linear dinâmica a 400 nm 32

Tabela 5 - Valores para a faixa linear dinâmica a 415 nm 32

Tabela 6 - Valores para o cálculo de resíduos a 400 nm 35

Tabela 7 - Valores para o cálculo de resíduos a 415 nm 35

Tabela 8 - LD e LQ a 400 nm 35

Tabela 9 - LD e LQ a 415 nm 35

Tabela 10 - Valores de absorbância, concentração e coeficiente de variação das amostras 36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AQQUA	Automação, Quimiometria e Química Ambiental
Anivsa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BioAs	Bioanálise de Solo
CV	Coeficiente de Variação
EC	*Enzyme Commission Number*
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e a Agricultura
IC	Intervalo de Confiança
Inmetro	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
LQQA	Laboratório de Quimiometria e Química Ambiental
MUB	Tampão Universal Modificado
OR	Osmose Reversa
PNG	*p*-nitrofenil-β-D-glicosídeo
*p*NP	*p*-nitrofenol
POP	Procedimento Operacional Padrão
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RR	Resposta Relativa
SQR	Substância Química de Referência
THAM	Tris(hidroximetil)aminometano
UV-Vis	Ultravioleta Visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO **1**
2. OBJETIVOS **2**
2.1. Objetivo geral **2**
2.2. Objetivos específicos **2**
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **2**
3.1. Enzimas no Solo **2**
3.1.1. Propriedades enzimáticas 3
3.1.2. Localização das enzimas no solo 4
3.2. Carboidratos no Solo **5**
3.2.1. Classificação dos Carboidratos 5
3.2.2. Ligações Glicosídicas 7
3.3. β-glicosidase **8**
3.3.1. Ciclo do carbono e degradação da celulose 9
3.3.2. Fatores que afetam a atividade enzimática 10
3.4. Metodologia segundo Tabatabai (1994) **12**
3.5. Evolução dos métodos de análise da β-glicosidase **14**
3.6. Validação analítica **16**
3.6.1. Seletividade 17
3.6.2. Efeito Matriz 19
3.6.3. Linearidade 20
3.6.4. Precisão e Exatidão 20
3.6.5. Faixa de Trabalho 21
3.6.6. Limite de Detecção (LD) 21
3.6.7. Limite de Quantificação (LQ) 22
4. METODOLOGIA **22**
4.1. Preparo das soluções de p-nitrofenol **22**
4.2. Curva analítica para obtenção da linearidade, LD e LQ **22**
4.3. Preparo das amostras **24**
4.4. Cálculo da faixa linear dinâmica **26**
4.5. Cálculo de LD e LQ **27**
4.6. Erros associados **27**
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO **28**
5.1. Média das absorbâncias e seus erros associados **28**
5.2. Regressão linear e faixa de linear dinâmica **30**
5.3. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) **33**
5.4. Homocedasticidade **37**
6. CONCLUSÕES **38**
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA **39**

1. INTRODUÇÃO

A saúde do solo é um aspecto importante para a produção agrícola, visto que o solo é a base para os sistemas de produção de alimento, de fibras e da agroenergia. No entanto, sua importância vai além da produtividade. A qualidade do solo também está relacionada à promoção da saúde humana, animal e vegetal. Além de desempenhar um papel essencial na conservação ambiental, contribui para o armazenamento e a filtragem da água, bem como para o sequestro de carbono (Mendes; Junior; Lopes, 2018).

Originalmente, a análise da qualidade do solo limitava-se à quantificação das propriedades físico-químicas, negligenciando o principal fator de compreensão para a saúde do solo: os processos biológicos. A partir da década de 1980 houve um crescente interesse na determinação da qualidade do solo pelos seus processos biológicos, com grande destaque para o pesquisador bioquímico Dr. M. Ali Tabatabai (Mendes; Junior; Lopes, 2018).

Em 1994, Tabatabai descreveu um método analítico que se consolidou como referência nos estudos sobre a qualidade biológica e a saúde dos solos. Esse método baseia-se na quantificação colorimétrica do *p*-nitrofenol (*p*NP), liberado durante a hidrólise do substrato sintético *p*-nitrofenil-β-D-glicosídeo (PNG), o qual reflete indiretamente a atividade enzimática da β-glicosidase. A β-glicosidase é uma enzima essencial ao ciclo do carbono, diretamente associada à degradação da matéria orgânica e à liberação de nutrientes (Tabatabai, 1994; Oliveira, 2022; FAO, 2021).

O método proposto por Tabatabai permanece sendo amplamente utilizado e referenciou o desenvolvimento da tecnologia BioAS (Bioanálise de Solo) pela Embrapa, que incorpora a quantificação das enzimas β-glicosidase e arilsulfatase como bioindicadores da qualidade do solo. Essa ampla aceitação deve-se à sua precisão, sensibilidade, simplicidade operacional e boa reprodutibilidade analítica (Mendes; Junior; Lopes, 2018; Mendes *et al.,* 2020).

Contudo, com o passar do tempo, diversas adaptações e modificações foram propostas para esse método, nem sempre devidamente documentadas ou explicadas, o que frequentemente geram dúvidas sobre a aplicação e a interpretação de seus resultados. Embora seja amplamente empregado em estudos

ambientais e agronômicos, ainda existem lacunas relacionadas à química analítica, como seus limites de quantificação, validação do método e a confiabilidade dos dados gerados.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo realizar a validação do método analítico para a quantificação da atividade enzimática da β-glicosidase, investigando criticamente sua adequação e desempenho como ferramenta analítica.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar um levantamento bibliográfico acerca da enzima β-glicosidase e a evolução do seu método de quantificação;
- Determinar a linearidade, o limite de detecção (LD), o limite de quantificação (LQ) e a homocedasticidade, através da construção de uma curva analítica;
- Realizar análise de amostras de solo para confirmar a precisão e exatidão no LD e LQ.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Enzimas no Solo

Para a manutenção da vida biológica e celular, é necessário um conjunto de reações químicas altamente específicas às necessidades dos organismos, capazes de gerar produtos bem definidos e que devem acontecer em uma velocidade compatível com a fisiologia celular (Marzzoco; Torres, 2015). No entanto, em sua maioria, essas reações são limitadas devido à elevada quantidade de energia requerida para a conversão dos reagentes em produtos, além do tempo necessário para que ocorram. Para superar essas limitações, as reações bioquímicas acontecem na presença de catalisadores, compostos capazes de reduzir a energia de ativação da reação, promovendo o aumento da sua velocidade sem serem consumidos durante o processo (IUPAC, 2021).

Do ponto de vista biológico, praticamente todas as reações que ocorrem nos organismos são mediadas por enzimas, que são macromoléculas, geralmente de natureza proteica, que atuam como catalisadores biológicos, acelerando as reações químicas (Harvey; Ferrier, 2012). As enzimas apresentam alta especificidade, e atuam, geralmente, em um único tipo de reação e sobre um substrato específico, dentro de inúmeras possibilidades reacionais (IUPAC, 2025; Marzzoco; Torres, 2015).

No solo, são responsáveis por catalisar processos essenciais, como a decomposição e a formação de matéria orgânica, a ciclagem de nutrientes e a manutenção das funções biológicas e físico-químicas do ecossistema. Dessa forma, sem a atuação enzimática, o solo não seria capaz de exercer adequadamente suas funções ecológicas (Figueiredo *et al.*, 2023).

3.1.1. Propriedades enzimáticas

Embora toda a estrutura enzimática contribua para sua estabilidade e funcionalidade, a interação com o substrato ocorre em uma região tridimensional específica da molécula, denominada sítio ativo. Essa cavidade é responsável pela alta especificidade da enzima, pois o substrato deve apresentar uma conformação espacial complementar ao sítio ativo e possuir grupos químicos capazes de interagir por meio de ligações precisas com os resíduos de aminoácidos localizados nessa região (Marzzoco; Torres, 2015).

Devido a essa especificidade, as enzimas reconhecem e catalisam reações envolvendo um único substrato ou um grupo muito restrito de substratos, promovendo apenas um tipo específico de reação química (Harvey; Ferrier, 2012). O grau de especificidade pode variar entre diferentes enzimas, algumas apresentam especificidade mais ampla, aceitam diferentes substratos com estruturas químicas semelhantes, enquanto outras são extremamente específicas, atuando exclusivamente sobre um único composto. No entanto, independentemente do grau, a especificidade enzimática é sempre superior à observada em catalisadores não biológicos (Harvey; Ferrier, 2012).

3.1.2. Localização das enzimas no solo

No solo, as enzimas podem ser encontradas em compartimentos associados tanto aos componentes vivos (bióticos) quanto às frações não vivas (abióticas). A somatória da atividade enzimática desses dois compartimentos resulta na atividade enzimática total do solo, a qual reflete tanto o histórico biológico quanto a atividade microbiana atual (Nannipieri; Trasar-Cepeda; Dick, 2018; Chaer *et al.*, 2023; Tabatabai; Dick, 2002). As enzimas localizam-se intracelularmente e/ou extracelularmente.

As enzimas intracelulares estão presentes no interior de células vivas de microrganismos, plantas e animais. Muitas delas encontram-se compartimentalizadas em organelas específicas, o que permite o isolamento do substrato ou do produto, evitando interferências de outras vias metabólicas competitivas. Esse mecanismo favorece a eficiência e o controle das reações bioquímicas no ambiente celular (Harvey; Ferrier, 2012).

Por outro lado, as enzimas extracelulares são aquelas que atuam fora das células vivas, diretamente no ambiente do solo, mantendo-se ativas mesmo após serem liberadas. Podem ter origem em processos de excreção ativa por células vivas, na lise celular ou na decomposição de detritos orgânicos (Nannipieri *et al.*, 2018; Tabatabai; Dick, 2002).

Na parte extracelular, utiliza-se o termo "abiótica", que segundo definição de Skujiņš (1978), refere-se às enzimas que, embora sejam de origem biológica, não estão mais associadas às células viáveis, pois foram adsorvidas, imobilizadas ou complexadas à matriz do solo, nas partículas de argila, óxidos de ferro e alumínio, ou matéria orgânica (Nannipieri *et al.*, 2018; Wallenstein; Burns, 2011).

Esse processo de adsorção confere a algumas enzimas proteção contra a degradação por proteases microbianas, enzimas responsáveis pela quebra de ligações peptídicas das proteínas. Como resultado, essas enzimas podem permanecer ativas por longos períodos, mesmo após a morte do organismo que as produziu, o que garante uma estabilidade funcional ao ambiente do solo (Chaer *et al.*, 2023). Esse fator proporciona a estabilidade estrutural que permite às enzimas abióticas atuarem como verdadeiras “impressões digitais” dos sistemas de manejo e práticas agrícolas anteriores do solo (Chaer *et al.*, 2023; Nannipieri *et al.*, 2018).

A enzima β-glicosidase possui a maior parte da sua atividade enzimática relacionada a sua forma abiótica (Lopes *et al.*, 2015).

3.2. Carboidratos no Solo

As enzimas possuem papel crucial em relação aos carboidratos, atuando como catalisadores em sua ciclagem e em sua degradação no solo e em sistemas biológicos (Deng; Popova, 2011).

Entre as biomoléculas, os carboidratos são os compostos mais abundantes na biosfera, superando lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Mendes, 2025). Desempenham diversas funções essenciais nos sistemas biológicos, atuam tanto como fonte e reserva de energia, quanto como componentes estruturais fundamentais. Estão presentes na membrana celular, na parede celular de bactérias, no exoesqueleto de insetos (como a quitina) e nas fibras de celulose das plantas (Harvey; Ferrier, 2012).

Historicamente, compostos como aldoses, que contêm um grupo funcional aldeído, e cetoses, que possuem um grupo cetona, foram denominados hidratos de carbono devido à sua fórmula empírica geral $C_n(H_2O)_n$ (IUPAC, 2025). No entanto, esse conceito se expandiu, e atualmente o termo carboidrato abrange compostos classificados como polihidroxialdeídos ou polihidroxicetonas, bem como substâncias que, por hidrólise, originam esses compostos (IUPAC, 2025; Marzzoco; Torres, 2015). Quando apresentam sabor adocicado, como a sacarose, glicose e frutose, os carboidratos são popularmente conhecidos como açúcares ou sacarídeos (Marzzoco; Torres, 2015).

No contexto do solo, a maior parte dos carboidratos é proveniente da biomassa vegetal, cuja composição é predominantemente formada por celulose (15 a 60%), hemicelulose (10 a 30%), lignina (5 a 30%) e proteína (2 a 15%), além de outros compostos orgânicos (Mendes, 2025).

3.2.1. Classificação dos Carboidratos

Os carboidratos são classificados de acordo com o número de unidades monossacarídicas que possuem, sendo divididos em monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos (Marzzoco; Torres, 2015).

Os monossacarídeos, também chamados de açúcares simples, representam as unidades mais básicas dos carboidratos. Os monossacarídeos com

cinco ou mais átomos de carbono tendem a existir predominantemente na sua forma cíclica, resultante da reação intramolecular entre o grupo aldeído ou cetona e uma hidroxila da própria molécula. Esse processo gera um novo centro quiral, denominado carbono anomérico, e origina dois isômeros de anel, conhecidos como formas α e β, que estão representados na Figura 1 (Harvey; Ferrier, 2012; Marzzoco; Torres, 2015).

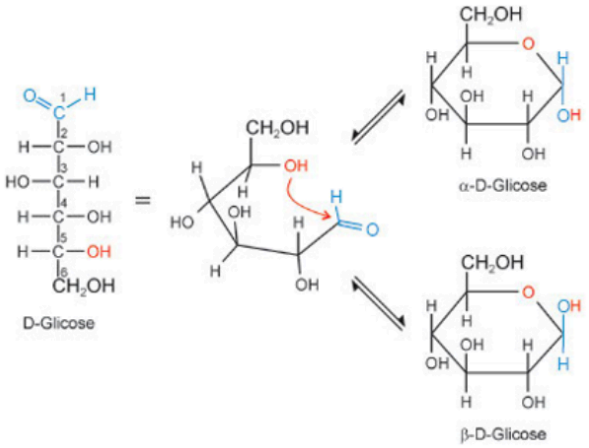


Figura 1 - Conversão da glicose da forma linear para a forma cíclica. O grupo aldeído do carbono 1 reage com o grupo hidroxila do carbono 5, formando um hemiacetal cíclico de seis membros, que pode existir como dois isômeros: α e β (Marzzoco; Torres, 2015)

Os anéis formados por cinco átomos (quatro carbonos e um oxigênio) são denominados furanoses, como observado na frutose. Já os anéis com seis membros (cinco carbonos e um oxigênio) recebem o nome de piranoses, como no caso da glicopiranose (Harvey; Fierrer, 2012).

Os oligossacarídeos são carboidratos formados pela união de um pequeno número de monossacarídeos, geralmente entre três a dez unidades, ligados por meio de ligações glicosídicas. Os oligossacarídeos mais conhecidos são os dissacarídeos que possuem apenas duas unidades de monossacarídeos, como é o caso da celobiose (Harvey; Fierrer, 2012; Marzzoco; Torres, 2015).

Por fim, os polissacarídeos são polímeros constituídos por mais de dez unidades de monossacarídeos, podendo ser organizados em cadeias lineares ou ramificadas. Um exemplo é a celulose, formada por unidades de glicose unidas por ligações β-1,4-glicosídicas que geram uma estrutura linear. Os seres humanos não conseguem digerir a celulose devido à ausência da enzima β-glicosidase, responsável pela hidrólise dessas ligações (Harvey; Fierrer, 2012).

3.2.2. Ligações Glicosídicas

As ligações glicosídicas são ligações covalentes responsáveis por unir monossacarídeos, formando oligossacarídeos e polissacarídeos, ou por conectar carboidratos a estruturas não-carboidratos (aglicona), chamados glicosídeos (Harvey; Ferrier, 2012; Marzzoco; Torres, 2015; Eivazi; Tabatabai., 1988). Essas ligações ocorrem entre o carbono anomérico de um açúcar e um grupo hidroxila (-OH) de outro açúcar ou álcool, com a liberação de uma molécula de água (Figura 2). Esse processo resulta na formação de glicosídeos com configuração α ou β, dependendo da orientação do grupo hidroxila no carbono anomérico (Voet; Voet; Pratt, 2015).

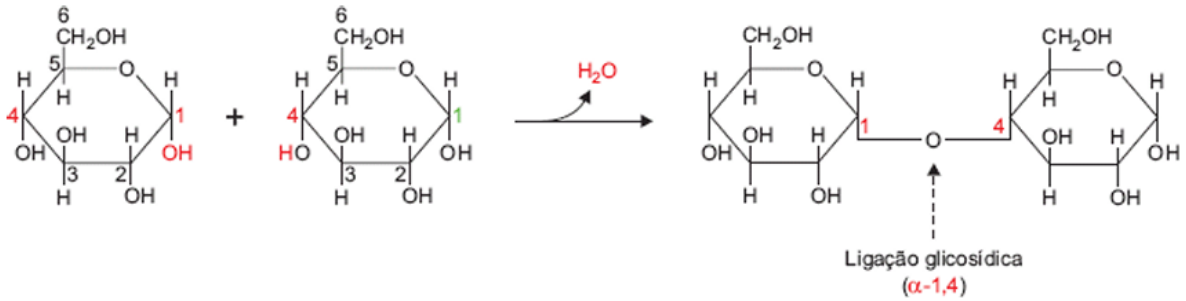


Figura 2 - Formação de ligação glicosídica com configuração α (Marzzoco; Torres, 2015)

Tais ligações são relativamente estáveis e sofrem hidrólise de forma lenta sob condições fisiológicas e necessitam da atuação das enzimas glicosidases para acelerar o processo (Voet; Voet; Pratt, 2015). Assim, quando o carbono anomérico está envolvido em uma ligação glicosídica, ele não pode alternar livremente entre as formas anoméricas α e β.

Quando o carbono anomérico não participa de uma ligação glicosídica, o grupo aldeído permanece livre, possibilitando a redução de agentes oxidantes fracos. Dessa forma, monossacarídeos e dissacarídeos que possuem carbonos anoméricos livres são denominados açúcares redutores. Por outro lado, os glicosídeos, nos quais o carbono anomérico está envolvido, não apresentam atividade redutora (Voet; Voet; Pratt, 2015).

A nomenclatura das ligações glicosídicas é definida pela configuração do carbono anomérico e pelas posições dos carbonos envolvidos na ligação. Assim, se o grupo hidroxila do carbono anomérico estiver orientado na mesma direção do

oxigênio do anel, a ligação é classificada como α. Se estiver em direção oposta, é classificada como β (Figura 3) (Harvey; Ferrier, 2012; Marzzoco; Torres, 2015).

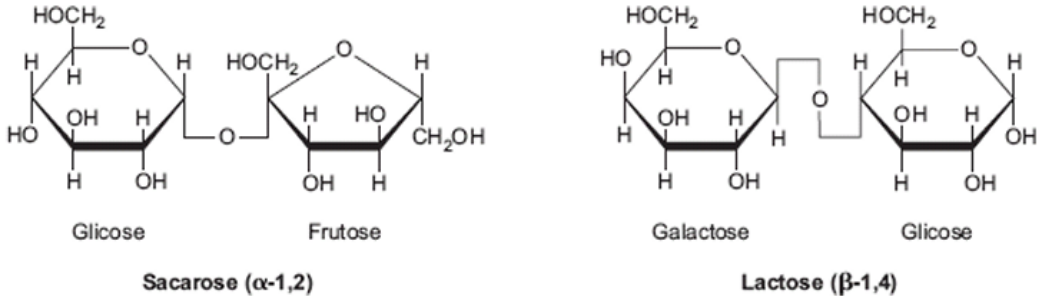


Figura 3 - Estruturas dos dissacarídeos mais comuns com conformações α e β (Marzzoco; Torres, 2015)

3.3. β-glicosidase



Figura 4 - Enzimas β-Glicosidase (Adaptada de Cairns; Esen, 2010)

As glicosidases (Figura 4), ou glicosídeo-hidrolases, constituem uma classe de enzimas hidrolíticas responsáveis por catalisar a clivagem de glicosídeos por meio da adição de uma molécula de água (hidrólise), promovendo a quebra da ligação glicosídica, e consequentemente, a liberação de um monossacarídeo e de uma aglicona (Eivazi; Tabatabai, 1988). Dentre as diversas enzimas pertencentes a esse grupo destaca-se a β-glicosidase (EC 3.2.1.21, segundo a IUBMB), devido sua importância funcional em diversos contextos biológicos e ecológicos.

A β-glicosidase é amplamente distribuída em diferentes organismos, incluindo plantas, animais, fungos, bactérias e leveduras (Datta, 2024; Mendes, 2025). No solo, essa enzima se destaca por sua elevada atividade e abundância, superando frequentemente as atividades de outras glicosidases, como α-glicosidases e α/β-galactosidases (Eivazi; Tabatabai, 1988; Tabatabai, 1994).

A β-glicosidase catalisa especificamente a hidrólise de ligações β-D-glicosídicas, como aquelas presentes na celobiose, liberando moléculas de

monossacarídeos, como a glicose (Gil-Sotres *et al.*, 2005). Esta enzima desempenha um papel crucial na etapa final e limitante da degradação da celulose no solo (Gil-Sotres *et al.*, 2005; Passinato *et al.*, 2021; Lopes *et al.*, 2015), sendo fundamental para o fornecimento de glicose como fonte de carbono e energia para os microrganismos do solo (Verchot; Borelli, 2005; Chaer *et al.*, 2023).

A atividade da β-glicosidase tem forte correlação com a degradação da matéria orgânica e a dinâmica do ciclo do carbono no solo, contribuindo para a transformação de resíduos vegetais complexos em compostos mais simples e biodisponíveis (Oliveira, 2022; FAO, 2021). Em virtude dessa função, esta enzima tem sido considerada um bioindicador sensível da saúde do solo, amplamente usado nas avaliações de qualidade e sustentabilidade de ecossistemas agrícolas e naturais (Passos *et al.*, 2008; Figueiredo *et al.*, 2023; Adetunji *et al.*, 2017).

3.3.1. Ciclo do carbono e degradação da celulose

O ciclo do carbono é um processo biogeoquímico fundamental que descreve o fluxo contínuo de carbono entre a atmosfera, biosfera, hidrosfera, pedosfera e litosfera (Silva; Kaschuk, 2023). No solo, o carbono é majoritariamente incorporado por meio da fixação do CO_2 atmosférico pelas plantas via fotossíntese, o qual é convertido em compostos orgânicos, como os carboidratos estruturais (Silva; Kaschuk, 2023; Marzzoco; Torres, 2015). A decomposição e mineralização desses compostos pelas comunidades microbianas presentes no solo resulta na liberação do carbono de volta ao ambiente (Silva; Kaschuk, 2023).

A celulose, um dos polímeros naturais mais abundantes na biosfera, constitui uma fração expressiva da biomassa vegetal. Trata-se de um polissacarídeo formado por longas cadeias lineares de unidades de glicose ligadas por ligações β-1,4-glicosídicas (Sobucki *et al.*, 2021; Ahmed *et al.*, 2017). Sua degradação no solo é realizada por um sistema enzimático conhecido como complexo celulolítico (Figura 5), que compreende três principais enzimas: endoglucanases, exoglucanases (ou celobiohidrolases) e β-glicosidases (Sobucki *et al.*, 2021; Deng; Popova, 2011).

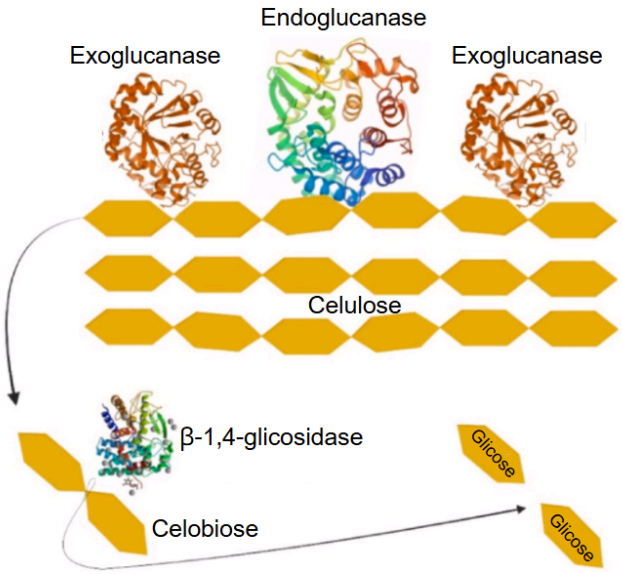


Figura 5 - Degradação da celulose (Adaptado de Datta, 2024)

A endoglucanase (EC 3.2.1.4, segundo a IUBMB) é a enzima responsável por iniciar a despolimerização da celulose. Ela atua cortando aleatoriamente as ligações β-1,4-glicosídicas no interior da cadeia polimérica, promovendo a fragmentação da estrutura celulósica e originando novas extremidades redutoras e não redutoras (Datta, 2024; Sobucki *et al.*, 2021).

As exoglucanases (EC 3.2.1.91, segundo a IUBMB), por sua vez, atuam nas extremidades das cadeias de celulose parcialmente degradadas. Elas catalisam a liberação de unidades de glicose ou celobiose a partir das extremidades redutoras ou não redutoras (Sobucki *et al.*, 2021).

Por fim, a β-glicosidase atua na última etapa do processo, hidrolisando a ligação glicosídica da celobiose e liberando moléculas de glicose (Datta, 2024). Essa glicose liberada representa uma fonte crucial de carbono e energia para os microrganismos do solo, prontamente incorporada aos seus processos metabólicos (Turner *et al.*, 2002; Figueiredo *et al.*, 2023; Mól *et al.*, 2023).

3.3.2. Fatores que afetam a atividade enzimática

Cada enzima apresenta respostas específicas às variações na concentração de substrato, temperatura e pH, possuindo um intervalo ideal de atuação no qual atinge sua máxima atividade catalítica (Harvey; Ferrier, 2012; Marzzoco; Torres, 2015). Essa condição ideal de acidez ou alcalinidade é

denominada pH ótimo. Nesse contexto, a atividade da β-glicosidase no solo é influenciada por fatores ambientais, físicos, químicos e práticas de manejo.

Entre os fatores ambientais, o pH exerce influência determinante na velocidade de reação e na atividade biológica da β-glicosidase. Estudos relatam que o intervalo ótimo de pH para a β-glicosidase situa-se entre 5,0 a 6,8, com maior estabilidade observada no pH 6,0 (Tabatabai, 1994; Esen, 2003; Silveira *et al.*, 2022). Desvios, em relação a essa faixa, tanto para valores mais ácidos (pH 4,3) quanto mais alcalinos (pH 8,5), resultam em redução progressiva da velocidade de reação (Adetunji *et al.*, 2017; Hinojosa *et al.*, 2004). Essa sensibilidade ao pH torna a β-glicosidase um marcador bioquímico eficaz para monitorar alterações ambientais, como processos de acidificação do solo (Adetunji *et al.*, 2017).

A umidade do solo é outro fator importante, pois em condições de seca ou baixa umidade, observa-se redução significativa da atividade da β-glicosidase, que compromete a decomposição da matéria orgânica e a liberação de nutrientes essenciais ao crescimento vegetal (Adetunji *et al.*, 2017).

A disponibilidade de substrato no solo, principalmente carboidratos derivados da decomposição da matéria orgânica, também regula a atividade desta enzima. O aumento na concentração de substrato promove, inicialmente, um aumento proporcional da velocidade de reação. No entanto, a partir do ponto de saturação, quando todos os sítios ativos da enzima estão ocupados, a velocidade atinge um platô denominado velocidade máxima (Vmax), permanecendo constante mesmo com o acréscimo de substrato (Harvey; Ferrier, 2012). Assim, práticas de manejo que aumentam o aporte de resíduos orgânicos, como a aplicação de fertilizantes orgânicos, uso de plantas de cobertura, manutenção da palhada após colheitas, tendem a elevar significativamente a atividade enzimática no solo (Mendes *et al.*, 2024).

Em relação à temperatura, a velocidade das reações enzimáticas aumenta proporcionalmente com o aumento desta, devido à maior energia cinética das moléculas, o que favorece o encontro entre enzima e substrato. Contudo, esse efeito positivo ocorre apenas até o limite em que a estrutura tridimensional da enzima permanece estável. A partir de temperaturas críticas, ocorre a desnaturação térmica da proteína, com consequente perda parcial ou total da atividade catalítica. A maioria das enzimas sofre desnaturação em temperaturas superiores a 50 a 55 °C (Harvey; Ferrier, 2012; Marzzoco; Torres, 2015). Técnicas como a solarização do

solo, por elevarem excessivamente a temperatura, podem reduzir a atividade da β-glicosidase (Passos *et al.*, 2008).

O tempo de meia-vida de uma enzima refere-se ao tempo necessário para que a atividade enzimática seja reduzida pela metade (Pacheco; Mendes, 2021). As β-glicosidases mais termoestáveis apresentam tempos de meia vida variáveis dependendo das condições de temperatura, pH e origem. Por exemplo, segundo Erkanli (2024) esse valor é de 4,4 min a 94ºC (*Thermococcus kodakarensis*) e 533 h a 70ºC (*Dictyoglomus thermophilum*). Já em *Lactobacillus brevis* o tempo de meia vida é de 4 dias a pH 4,0 e 50 dias em pH 7,0 (Ahmed *et al.*, 2017).

Nos ensaios laboratoriais, utiliza-se frequentemente 37 °C para maximizar a atividade enzimática e aumentar a sensibilidade do método, mesmo que, no solo, a temperatura ótima da β-glicosidase possa variar naturalmente (Deng; Popova, 2011; Nannipieri *et al.*, 2018).

A profundidade do solo também interfere na atividade enzimática da β-glicosidase. Em geral, observa-se maior atividade nas camadas superficiais, onde há maior abundância de microrganismos e disponibilidade de substratos orgânicos. Com o aumento da profundidade, a atividade tende a diminuir, acompanhando a redução da biomassa microbiana e do teor de carbono orgânico (Adetunji *et al.*, 2017).

Por fim, aspectos metodológicos relacionados à coleta e ao preparo das amostras influenciam diretamente nos resultados das análises. Estudos mostram que a secagem ao ar livre pode afetar a atividade de algumas enzimas, contudo a β-glicosidase apresenta relativa estabilidade em amostras secas (Eivazi; Tabatabai, 1990; Tabatabai, 1994; Silveira *et al.*, 2022).

3.4. Metodologia segundo Tabatabai (1994)

Na década de 90, Tabatabai estabeleceu a metodologia de quantificação da atividade da β-glicosidase no solo, que se consolidou como referência e base para as análises enzimáticas atuais. O método é amplamente utilizado devido à sua precisão, sensibilidade e simplicidade operacional, originalmente desenvolvido para a análise de fosfatases, mas posteriormente adaptado para a β-glicosidase e outras hidrolases (Evangelista *et al.*, 2012; Tabatabai, 1994). Essa técnica baseia-se na quantificação colorimétrica do *p*-nitrofenol (*p*NP), composto de cor amarelada que é

liberado durante a hidrólise do substrato sintético incolor *p*-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (PNG), catalisada pela β-glicosidase (Figura 6) (Mól *et al.*, 2023).

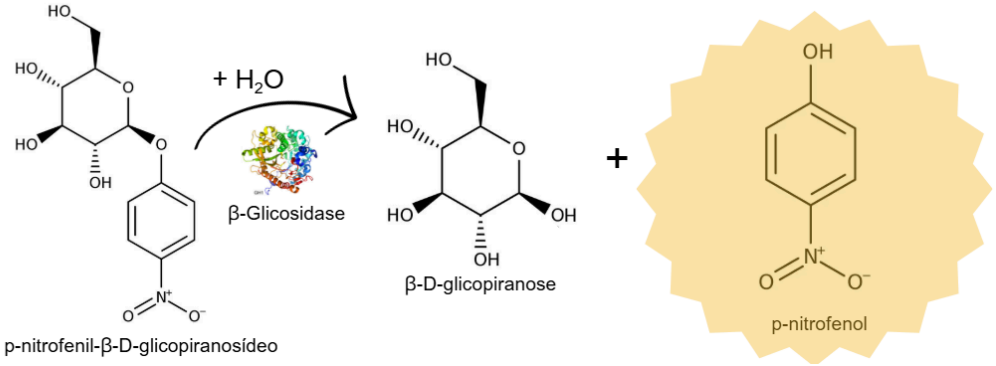


Figura 6 - Hidrólise do PNG catalisado pela β-glicosidase (própria autora)

O procedimento analítico original consiste na peneiração (< 2 mm) de 1,00 g de solo, ao qual é adicionado solução de PNG (0,05 M), tolueno e tampão universal modificado (MUB a pH 6,0) para ser incubado por 1 h a 37ºC (Tabatabai, 1994; Evangelista *et al.*, 2012).

Após o período de incubação, a reação é interrompida com a adição de 1,0 mL de solução de $CaCl_2$ 0,5 M e 4,0 mL de tampão THAM (Tris(hidroximetil)aminometano) em pH 12,0. A escolha do tampão THAM, em substituição ao NaOH, utilizado em outros ensaios enzimáticos, é crucial para evitar a hidrólise química do PNG, que poderia comprometer a precisão dos resultados (Tabatabai, 1994). O $CaCl_2$, por sua vez, atua como estabilizante, prevenindo a dispersão de partículas de argila e a extração indesejada de matéria orgânica (Deng; Popova, 2011).

A seguir, a suspensão é filtrada e quantificada por espectrofotometria UV-Vis, na faixa de comprimento de onda entre 400 a 420 nm, intervalo no qual o *p*NP apresenta absorção máxima (Tabatabai, 1994). Para assegurar a confiabilidade da análise, são incluídos controles (amostras-branco), nos quais o substrato é adicionado apenas após a interrupção da reação (Deng; Popova, 2011).

A curva analítica é preparada com soluções padrão de *p*NP em concentrações conhecidas (0, 1, 2, 3, 4 e 5 µg/mL), preparados com 5,0 mL de água destilada, 1,0 mL de $CaCl_2$ 0,5 M e 4,0 mL de THAM pH 12,0 (Tabatabai, 1994).

3.5. Evolução dos métodos de análise da β-glicosidase

O método de quantificação da atividade enzimática da β-glicosidase em solos passou por uma evolução significativa ao longo das últimas décadas, acompanhando a crescente demanda por indicadores biológicos sensíveis e confiáveis da qualidade e saúde do solo.

Os primeiros estudos sobre a atividade da β-glicosidase remontam à década de 1950, quando Barnett e colaboradores investigaram a atividade dessa enzima 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. Os autores também observaram que o meio de cultivo, por si só, nem sempre era suficiente para induzir a atividade da β-glicosidase (Barnett; Indram; Swain, 1956).

Um marco relevante ocorreu em 1969, quando Bremner e Tabatabai desenvolveram uma metodologia padrão para a determinação colorimétrica de enzimas no solo. Naquele estudo, o foco foi a quantificação do *p*-nitrofenol (*p*NP) liberado pela hidrólise do *p*-nitrofenil fosfato pela enzima fosfatase. Posteriormente, essa abordagem foi adaptada para outras enzimas, incluindo a β-glicosidase e serviu como base metodológica para avanços posteriores (Bremner; Tabatabai, 1969).

Em 1972, Koichi Hayano propôs um método inovador para a quantificação direta da atividade da β-glicosidase em solos, utilizando o substrato sintético *p*-nitrofenil-β-D-glicosídeo (PNG). A metodologia consistia na incubação de amostras de solo com PNG (0,1 M), tampão McIlvaine (pH 4,8) e tolueno, a 30 °C por 1 h, com posterior leitura espectrofotométrica a 400 nm. Embora o método tenha demonstrado boa correlação entre o tempo de incubação e a liberação de *p*NP, não chegou a ser amplamente adotado (Hayano, 1972).

Décadas mais tarde, Eivazi e Tabatabai (1988) consolidaram uma metodologia simples e precisa para a determinação da atividade da β-glicosidase no solo. O método consistia na incubação de amostras de solo com PNG na presença de tolueno, seguida da quantificação do *p*NP liberado por espectrofotometria na faixa de 400 a 420 nm, após incubação a 37 °C por 1 h. A técnica, baseada na coloração amarela do *p*NP em meio alcalino, apresentou alta sensibilidade e foi um avanço importante para estudos da saúde do solo (Eivazi; Tabatabai, 1988).

Em 1994, Tabatabai publicou o protocolo definitivo de quantificação da β-glicosidase, incorporando ajustes metodológicos como o uso de tampões universais e a padronização do pH ótimo. Essa publicação tornou-se a principal referência para estudos posteriores e é, até hoje, a base para métodos adaptados amplamente utilizados em laboratórios de análise de solo (Tabatabai, 1994).

Nos anos seguintes, adaptações ao método original surgiram para otimizar e simplificar os ensaios. Anteriormente, usava-se tolueno, um agente antisséptico, com o objetivo de inibir o crescimento microbiano e impedir a assimilação dos produtos da reação (Klose; Tabatabai, 2002). Contudo, Bandick e Dick (1999) observaram que o uso de tolueno poderia ser dispensado em experimentos com curtos períodos de incubação (< 2 h) sem comprometer a atividade detectada. Essa conclusão foi confirmada por Verchot e Borelli (2005) em solos tropicais, onde não foram verificadas diferenças significativas na atividade da enzima com ou sem a adição de tolueno (Bandick; Dick, 1999; Verchot; Borelli, 2005; Lisboa, *et al.* 2012).

Mais recentemente, a EMBRAPA implementou o uso da β-glicosidase como bioindicador da qualidade do solo por meio da tecnologia Bioanálise de Solo (BioAS), lançada em 2020. Essa metodologia, baseada na proposta de Tabatabai (1994), foi simplificada pela exclusão do tolueno, tornando-a mais acessível para análises de rotina (Mendes; Junior; Lopes, 2018; Mendes *et al.,* 2020).

Uma inovação da BioAS foi a adaptação do método para o uso de amostras secas ao ar, coletadas no período pós-colheita, dentro do conceito FERTBIO. Essa abordagem unifica os procedimentos de coleta, preparo e análise para fins químicos e biológicos e viabiliza sua implementação em larga escala por agricultores e laboratórios (Mendes *et al.*, 2024). Além disso, foram desenvolvidas tabelas interpretativas específicas para Latossolos Vermelhos argilosos do Cerrado, que classifica 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 e 2024).

Em 2021, a Embrapa também publicou um guia técnico para caracterização de enzimas do solo e apresentou estudos sobre o comportamento da β-glicosidase frente a variáveis como temperatura, pH, presença de inibidores e concentração de íons metálicos, o que contribuiu para a validação e refinamento metodológico (Pacheco; Mendes, 2021). Nessa mesma época, Acosta-Martinez e

colaboradores (2021) relataram que é possível manter a mesma absorbância por amostra mesmo utilizando-se 0,05 g de solo e metade de todas as soluções do ensaio, sem causar alteração nas proporções originais, com redução significativa nos recursos e resíduos gerados.

Mais recentemente, em 2025, a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) publicou um Procedimento Operacional Padrão (POP) para avaliação da atividade enzimática em solos, baseado nos métodos de Tabatabai (1994), Dick e colaboradores (1996) e Acosta-Martínez e colaboradores (2021). A publicação deste documento evidencia o reconhecimento global da importância da enzima β-glicosidase como um bioindicador-chave para monitoramento ambiental e agrícola (Mendes, 2025).

3.6. Validação analítica

Com base na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166, publicada em 2017 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), a validação analítica é um processo que avalia sistematicamente um método por meio de ensaios experimentais, os quais permitem conferir e fornecer evidências científicas e objetivas de que os requisitos específicos para sua aplicação pretendido são devidamente atendidos (Brasil, 2017). Esse processo é essencial no desenvolvimento e na aplicação de ensaios laboratoriais, uma vez que assegura a obtenção de resultados precisos, reprodutíveis e confiáveis (Marsona *et al.*, 2020; Ribani *et al.*, 2004). Dessa forma, o principal objetivo ao realizar uma validação é demonstrar que o método analítico é adequado para a finalidade destinada, garantindo a integridade e a credibilidade dos dados gerados (Brasil, 2017; Marsona *et al.*, 2020; Ribani *et al.*, 2004).

A utilização de métodos não validados pode comprometer significativamente a confiabilidade dos resultados, que conduz a interpretação equivocada e decisões técnicas inadequadas, as quais podem gerar possíveis prejuízos econômicos (Ribani *et al.,* 2004). No contexto da quantificação enzimática, a obtenção de dados inconsistentes pode levar à adoção de práticas de manejo do solo desnecessárias ou prematuras, com impacto negativo na eficiência produtiva. Além disso, compromete-se a validação da eficácia de determinadas técnicas

agronômicas, prejudicando a confiabilidade de estudos subsequentes e o planejamento de intervenções futuras.

A validação de métodos analíticos pode ser classificada por diferentes tipos, como a validação laboratorial e a validação completa. A validação laboratorial, também conhecida como "*in house validation*" ou validação interna, é realizada dentro de um único laboratório e tem como objetivo avaliar métodos em desenvolvimento ou verificar a aplicabilidade de métodos já existentes. Essa etapa é considerada a preliminar no processo de validação completa, sendo preciso avaliar, pelo menos, os parâmetros de precisão, exatidão e seletividade (Brasil, 2017; Ribani *et al.*, 2004). Já a validação completa envolve a avaliação de todas as características de desempenho do método, inclusive estudos interlaboratoriais destinados a verificar sua reprodutibilidade em diferentes ambientes analíticos. Essa etapa permite a determinação da incerteza expandida associada ao método, indispensável para que a metodologia seja oficializada (Ribani *et al.*, 2004).

Para a execução adequada da validação analítica, diversas agências reguladoras estabeleceram diretrizes técnicas e normativas, as quais servem de referência para a indústria, os laboratórios de controle de qualidade e as autoridades regulatórias. No Brasil, os principais órgãos responsáveis por estabelecer esses critérios são a Anvisa e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro) (Brasil, 2017; Ribani *et al.*, 2004).

Para o presente trabalho, optou-se em seguir a RDC nº 166/2017 estabelecida pela Anvisa, que define os critérios e recomendações para a validação de métodos analíticos aplicáveis a insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos biológicos. Essa norma estabelece que os parâmetros e os respectivos critérios de aceitação devem ser definidos com base nas características do analito e na natureza do método analítico empregado. Entre os principais parâmetros recomendados encontram-se: seletividade, linearidade, faixa de aplicação, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) (Brasil, 2017; Ribani *et al.*, 2004).

3.6.1. Seletividade

No Art. 21 da RDC nº 166/2017, a Anvisa estabelece que a seletividade é a capacidade de um método identificar ou quantificar a resposta analítica atribuída exclusivamente ao analito de interesse, sem interferência de componentes que

podem estar presentes na amostra, como diluente, impurezas ou produtos de degradação (Brasil, 2017). Assim, a primeira etapa para validação de um método, é definir se o método é seletivo, uma vez que a ausência de seletividade compromete diretamente a confiabilidade de outros parâmetros do método, como a linearidade (Ribani *et al.*, 2004). Para métodos não cromatográficos, fica isento a demonstração de ausência de interferência de produtos de degradação gerados por mudanças de pH, temperatura, oxidação e de luz (Brasil, 2017).

A seletividade do método avaliado é assegurada pelo uso do *p*-nitrofenol como substância de referência, visto que se trata de um composto sintético (Buan *et al.*, 2021), não encontrado naturalmente no solo. Essa característica evita interferências do diluente ou da matriz (Mendes, 2025). Para a análise, o substrato sintético *p*-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (PNG) é adicionado às amostras de solo antes do período de incubação. A β-glicosidase presente no solo catalisa a quebra da ligação glicosídica entre o *p*-nitrofenol e o β-D-glicopiranose, liberando p-nitrofenol (Eivazi *et al.*, 1988), que em pH alcalino, adquire coloração amarela (Buan *et al.*, 2021) e pode ser quantificado por espectrofotometria UV-Vis. Por outro lado, o β-D-glicopiranose, um açúcar, não é detectado pelo método, garantindo que apenas o *p*-nitrofenol seja mensurado (Tabatabai, 1994; Deng; Popova, 2011).

Durante a quantificação do *p*-nitrofenol, observou-se (Figura 7) a presença de duas bandas características no espectro de absorção. A banda mais intensa corresponde à forma desprotonada (fenolato) do *p*-nitrofenol, que, em meio alcalino (pH > 7), encontra-se predominantemente na forma aniônica. Essa espécie apresenta um máximo de absorção na faixa de 400 a 420 nm, responsável pela coloração amarela característica da solução (Syedd-Léon, 2020).

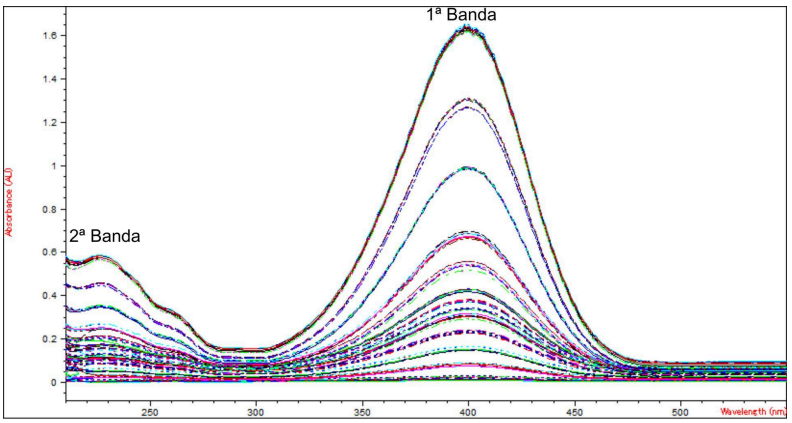


Figura 7 - Absorbância do *p*-nitrofenol (própria autora)

A segunda banda, localizado na região de 200 a 230 nm, é atribuído a absorção relacionada à transição π-π* do anel benzênico de monoaromáticos (Xiong *et al.*, 2016). A presença da segunda banda (Figura 7) no ultravioleta profundo não interfere na quantificação do *p*-nitrofenol desprotonado, uma vez que há uma separação espectral clara entre as duas regiões de absorção, garantindo, assim, a seletividade do método analítico.

3.6.2. Efeito Matriz

O efeito matriz é a influência da composição da amostra (a matriz) na resposta analítica de um analito específico (Brasil, 2017). Essencialmente, ele ocorre quando substâncias presentes na amostra, que não são a substância alvo, distorcem a resposta instrumental do analito, causando um erro proporcional (Marsona *et al.*, 2020).

Para métodos aplicados a matrizes complexas, como amostras de solo, é fundamental avaliar o efeito matriz. Conforme a RDC nº 166/2017, essa avaliação deve ser feita por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas analíticas construídas com a substância química de referência (SQR) diluída em solvente e com a mesma SQR adicionada a uma amostra real (amostra fortificada). Ambas as curvas devem ser elaboradas com o mesmo número de pontos (mínimo de cinco concentrações diferentes) e replicadas, seguindo os mesmos critérios adotados para o estudo de linearidade. A ausência de interferência da matriz é demonstrada pela semelhança estatística entre as inclinações das curvas (paralelismo) e exige-se o uso de teste de hipótese com nível de significância de 5% (Brasil, 2017).

Em estudo recente publicado em 2025 no periódico *Pedobiologia Journal of Soil Ecology*, Silva e colaboradores compararam os métodos de curva analítica externa e de adição de padrão para avaliar o efeito matriz. Os autores demonstraram que, mesmo na presença de solo, a resposta analítica é exclusivamente atribuída ao *p*NP, acontecendo apenas variações na intensidade de detecção. Contudo, essas variações não alteram as tendências relativas da atividade enzimática, indicando que os resultados permanecem consistentes ao comparar diferentes tipos de solo (Silva; Kaschuk, 2025).

Dessa forma, não se faz necessária a realização de novos experimentos para comprovação da seletividade e efeito matriz, uma vez que estes resultados foram recentemente publicados.

3.6.3. Linearidade

A linearidade é a capacidade do método em fornecer respostas diretamente proporcionais às concentrações do analito ao longo de uma faixa. De acordo com o, essa avaliação deve abranger toda a faixa estabelecida para o método, demonstrada experimentalmente por, no mínimo, cinco diferentes concentrações da substância química de referência (SQR) em triplicata. As soluções podem ser diluições de uma mesma solução estoque, desde que preparadas de forma independente, assegurando a representatividade e reprodutibilidade dos dados (Brasil, 2017).

Para validar essa relação linear, exige-se a apresentação de uma série de parâmetros estatísticos, como: gráfico das respostas analíticas em função da concentração do analito, gráfico de dispersão dos resíduos, equação da reta de regressão linear estimada pelo método dos mínimos quadrados, além dos coeficientes de correlação (R) e de determinação (R^2), os quais devem ser maiores que 0,990. Avalia-se a significância estatística do coeficiente angular da reta, que deve ser diferente de zero e indicar dependência entre a resposta e a concentração (Brasil, 2017).

Também é preciso verificar a homocedasticidade dos dados, isto é, a constância da variância ao longo da faixa de concentração. Todas as análises estatísticas devem ser conduzidas com um nível de significância de 5%, conforme estabelecido pela Anvisa (Brasil, 2017).

3.6.4. Precisão e Exatidão

A precisão é a proximidade de concordância entre os resultados obtidos a partir de medições repetidas de uma mesma amostra homogênea, sob condições definidas. De acordo com o Art. 33 da RDC nº 166/2017, a precisão é demonstrada pela dispersão dos resultados através do cálculo do coeficiente de variação (CV) de amostras preparadas de maneira independente, sob as mesmas condições de operação (Brasil, 2017). Métodos com baixo CV são considerados mais precisos,

sendo recomendável, em análises de solos, valores de CV inferiores a 15% para resultados laboratoriais consistentes (Couto, 2013).

Já a exatidão avalia a proximidade entre o resultado obtido e o valor verdadeiro ou de referência (Miller; Miller, 2010). Nesse contexto, o uso de materiais de referência certificados (MRC) é fundamental, pois eles apresentam valores de concentração estabelecidos com alto grau de confiabilidade, rastreados a padrões metrológicos reconhecidos internacionalmente, além de conter informações sobre a incerteza associada . No presente estudo, entretanto, a exatidão não foi calculada devido à indisponibilidade de amostras certificadas específicas para a matriz e os analitos em questão. Essa limitação impossibilitou a determinação do viés em relação a um valor verdadeiro, restringindo a avaliação da qualidade analítica ao parâmetro de precisão e a outros controles internos implementados no laboratório.

3.6.5. Faixa de Trabalho

A faixa de trabalho de um método analítico corresponde ao intervalo de concentrações onde resultados obtidos são considerados confiáveis, com base na linearidade, precisão e exatidão demonstradas. De acordo com a Anvisa (RDC nº 166/2017), essa faixa deve ser definida considerando a finalidade específica do método. No caso de determinação de teor, por exemplo, recomenda-se que a faixa de trabalho compreenda valores entre 80% e 120% da concentração nominal do analito (Brasil, 2017).

3.6.6. Limite de Detecção (LD)

O limite de detecção (LD) refere-se à menor quantidade de um analito detectada por um método analítico, embora não necessariamente quantificada com exatidão. A RDC nº 166/2017 permite que o LD seja estimado por diferentes abordagens, entre elas: a observação visual, a razão sinal-ruído ou o uso de parâmetros estatísticos derivados da curva analítica. Para métodos visuais, o LD é definido pela menor concentração capaz de produzir uma resposta perceptível. Já para métodos instrumentais, o LD pode ser determinado com base em uma razão sinal-ruído maior ou igual a 3:1. Além disso, o LD pode ser calculado por fórmulas específicas. Em casos de estimativa por cálculo ou extrapolação, a confirmação experimental é obrigatória, conforme orientações adicionais da resolução (Brasil, 2017).

3.6.7. Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração de analito que pode ser determinada com níveis aceitáveis de precisão e exatidão, sob as condições do ensaio. Assim como o LD, o LQ pode ser calculado com base na curva analítica ou determinado pela razão sinal-ruído, neste caso, a relação mínima recomendada é de 10:1. Além disso, é preciso atestar a precisão e a exatidão nas concentrações equivalentes ao LQ (Brasil, 2017).

4. METODOLOGIA

4.1. Preparo das soluções de *p*-nitrofenol

O preparo das soluções estoque e padrão de *p*-nitrofenol foi realizado de acordo com as exigências da RDC nº 166/2017, que estabelece a utilização de soluções independentes para o preparo das curvas analíticas em quintuplicata. Portanto, uma única solução estoque foi preparada (1,0 g/L) e, a partir dela, preparou-se cinco soluções padrão.

Para o preparo da solução estoque pesou-se 0,5010 g de *p*NP (Sigma-Aldrich, código 104-8) em uma balança analítica com precisão de quatro casas decimais (Shimadzu ATX24R). O sólido foi inicialmente dissolvido com água de osmose reversa (OR) em béquer (500 mL) e com auxílio de agitação magnética. Após completa solubilização, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 500 mL e teve seu menisco aferido. Esta solução estoque foi armazenada em frasco âmbar e mantida sob refrigeração. A partir desta solução estoque, foram preparadas cinco soluções padrão de *p*NP de mesma concentração (25,0 µg/mL).

Embora os procedimentos descritos na literatura apresentam variações quanto à concentração da solução padrão de *p*-nitrofenol, a concentração sugerida pela Procedimento Operacional Padrão (POP) da FAO (2025) é de 10,0 µg/mL. Neste estudo optou-se por uma concentração mais elevada (25,0 µg/mL) para avaliar uma ampla faixa linear do método.

4.2. Curva analítica para obtenção da linearidade, LD e LQ

Para a determinação da linearidade, bem como dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), foi construída uma curva analítica externa para a

β-glicosidase, seguindo os procedimentos descritos por Tabatabai (1994), em conformidade com o POP publicado recentemente pela FAO (2025).

A curva analítica foi elaborada em quintuplicata (replicatas autênticas). O preparo seguiu a seguinte sequência: água OR, solução padrão de *p*NP (25,0 µg/mL), solução de $CaCl_2$ 0,5 M e tampão THAM em pH 12, nos volumes apresentados na Tabela 1. As soluções foram manipuladas com micropipetas calibradas de diferentes volumes (10–100 µL (Swiss+Made), 100–1000 µL (Swiss+Made) e 1000–5000 µL (Olen)) para assegurar maior precisão no preparo.

Tabela 1 - Volumes de padrão e reagentes para o preparo da curva analítica da β-glicosidase

Ponto	*p*NP (µg)*	*p*NP (µg/mL)	Água OR (mL)	*p*NP 25,0 µg/mL (mL)	$CaCl_2$ 0,5 M (mL)	THAM pH 12 (mL)
Branco	0,0	0,00	5,00	0,00	1,00	4,00
1	0,5	0,05	4,98	0,02	1,00	4,00
2	1,0	0,10	4,96	0,04	1,00	4,00
3	5,0	0,50	4,80	0,20	1,00	4,00
4	10,0	1,00	4,60	0,40	1,00	4,00
5	15,0	1,50	4,40	0,60	1,00	4,00
6	20,0	2,00	4,20	0,80	1,00	4,00
7	22,5	2,25	4,10	0,90	1,00	4,00
8	25,0	2,50	4,00	1,00	1,00	4,00
9	30,0	3,00	3,80	1,20	1,00	4,00
10	40,0	4,00	3,40	1,60	1,00	4,00
11	50,0	5,00	3,00	2,00	1,00	4,00
12	75,0	7,50	2,00	3,00	1,00	4,00
13	100,0	10,0	1,00	4,00	1,00	4,00
14	125,0	12,5	0,00	5,00	1,00	4,00

* Estes valores são calculados a partir dos valores de concentração (3ª coluna) e considerando o fator de correção referente a extração de 10,0 g de solo.

Os valores de concentrações de *p*NP em µg/mL foram dispostos na Tabela 1. Contudo, nas tabelas subsequentes, optou-se em expressar o *p*NP em unidade de massa (µg), mantendo a concordância com os resultados finais, os quais são apresentados em massa de *p*NP por massa de solo.

Isso ocorre, pois, ao realizar os preparos de amostras (tópico 4.3), o solo é extraído por um volume fixo de 10 mL, o que acarreta também na diluição do *p*NP extraído das amostras de solos em 10x. Contudo, ao construir a curva analítica, os seus valores são obtidos em mL, exigindo a multiplicação deles pelo volume correspondente, fazendo um ajuste final e obtendo a massa total.

Para simplificar a interpretação dos dados e dos gráficos gerados, e manter a padronização do POP publicado pela FAO, o qual expressa diretamente os valores em massa de *p*NP ajustados pelo volume (multiplicando por 10), optou-se por apresentar todos os resultados de forma compatíveis com o cálculo final por massa de solo, ou seja, expressando os valores diretamente em massa de *p*NP.

Posteriormente, usando cubeta de quartzo, mediu-se as soluções no espectrofotômetro UV-Vis Agilent Cary 8454, utilizando o software UV-Visible ChemStation 2001-2014. Cada ponto da curva foi lido em triplicata, nos comprimentos de onda de 400 nm e 415 nm.

Conforme estabelecido por Tabatabai (1994), a faixa de leitura ideal para a detecção do *p*-nitrofenol liberado pela atividade da β-glicosidase situa-se entre 400 nm a 420 nm, sendo 400 nm o comprimento de onda que corresponde à absorbância máxima do composto. Entretanto, estudos posteriores, como o de Deng e Popova (2011), demonstraram que a leitura em 415 nm pode minimizar erros analíticos decorrentes de interferências. Já o POP da FAO (2025) recomenda a leitura exclusivamente em 400 nm. Diante disso, no presente estudo adotou-se os comprimentos de onda de 400 nm e 415 nm para a leitura das amostras e demonstração dos resultados.

4.3. Preparo das amostras

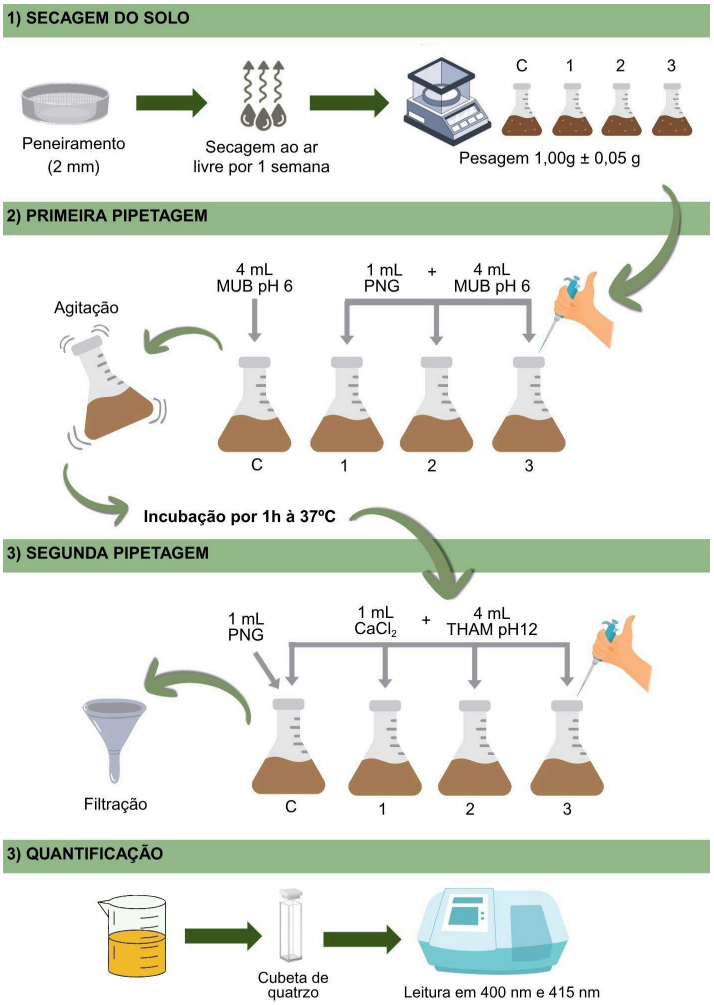


Figura 8 - Procedimento de preparo de amostra (própria autora)

A partir de quatro amostras de solos enviados por projetos parceiros para a avaliação das atividades enzimáticas, realizou-se a análise de precisão do método requerida para a validação do limite de quantificação. Assim, os solos coletados foram peneirados (< 2 mm) e removeu-se os materiais grosseiros, como raízes e insetos, com uma pinça. Em seguida, colocou-se as amostras em placas de petri de plástico, cobertas com papel alumínio perfurado para auxiliar na secagem ao ar em temperatura ambiente. Após uma semana, realizou-se a análise dos solos.

Para isso, pesou-se 1,00 g (± 0,05 g) de solo seco em quatro Erlenmeyers, três para as replicatas e um para o controle, a fim de minimizar o efeito matriz. Em cada frasco, adicionou-se 4,0 mL de MUB pH 6,0, e, apenas nas replicatas, 1,0 mL de solução de PNG 0,05 M. Após o período de incubação (37ºC por 1h), pipetou-se 1,0 mL de $CaCl_2$ 0,5 M e 4,0 mL de tampão THAM pH 12,0 em todas as alíquotas. Finalmente adicionou-se 1,0 mL de PNG 0,05M ao controle (Figura 8).

As alíquotas foram filtradas (papel qualitativo JProlab-Quanty) e usando cubeta de quartzo, mediu-se as soluções no espectrofotômetro UV-Vis. O controle foi analisado na função "*blank",* que permite a subtração automática do valor do controle e, por consequência, minimizar o efeito matriz. Repetiu-se o mesmo processo para todas as amostras, as quais foram medidas em triplicata com a função "*sample"*, nos comprimentos de onda de 400 nm e 415 nm.

Calculou-se as concentrações da atividade da β-glicosidase através da equação da reta obtida pela regressão linear e seus resultados foram expressos em microgramas de *p*-nitrofenol liberados por grama de solo por hora (µg *p*NP/g.solo.h), unidade equivalente a miligramas por quilograma por hora (mg/kg.h), o que facilita a interpretação agronômica e a comparação entre diferentes condições edafoclimáticas e sistemas de manejo (Mendes, 2025).

4.4. Cálculo da faixa linear dinâmica

Na espectrofotometria, espera-se uma proporcionalidade direta entre a concentração do analito (x) e a absorbância medida (y), possibilitando a construção de uma regressão linear. No entanto, essa relação não se mantém indefinidamente, ela é válida apenas dentro de um intervalo específico de concentrações, conhecido como faixa linear dinâmica. Fora dessa faixa, podem ocorrer desvios devido a limitações instrumentais ou saturação do sistema detector (Ribani *et al.*, 2004).

Ribani e colaboradores (2004) descrevem três estratégias para avaliar se os pontos de uma curva analítica estão contidos na faixa linear dinâmica. Para este trabalho, escolheu-se uma dessas abordagens, a qual consiste em calcular as respostas relativas (RR), segundo a equação (1). Em seguida, construiu-se um gráfico com as respostas relativas no eixo y e as concentrações, em escala logarítmica, no eixo x. Na faixa linear, espera-se que a linha resultante seja aproximadamente horizontal, refletindo uma relação constante entre sinal e concentração.

$$RR = \frac{sinal\ obtido\ (absorbância)}{concentração} \quad (1)$$

Para a verificação da linearidade, são traçadas no gráfico duas linhas horizontais adicionais, delimitando os intervalos de 80% e 120%, conforme estabelecido pela RDC nº 166/2017. Os pontos da curva que permanecem dentro

desse intervalo são considerados pertencentes à faixa linear do método (Brasil, 2017).

4.5. Cálculo de LD e LQ

Para o cálculo do limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ), além da avaliação visual dos espectros, foram aplicadas as equações recomendadas pela RDC nº 166/2017, equação (2) e equação (3), respectivamente:

$$LD = \frac{3{,}3 \cdot \sigma}{a} \tag{2}$$

$$LQ = \frac{10 \cdot \sigma}{a} \tag{3}$$

Em que: a é a inclinação da curva analítica, σ é o desvio padrão residual da regressão linear, calculado a partir da equação (5).

O desvio padrão residual (σ) foi determinado com base nos resíduos (r), obtidos conforme a equação (4):

$$Resíduo = y_{medido} - y_{esperado} \tag{4}$$

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

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(resíduo^2)}{n-2}} \tag{5}$$

4.6. Erros associados

Com o auxílio do software Excel, foi determinado o desvio padrão (s) e o intervalo de confiança (IC) por meio da função, considerando um nível de significância (α) de 0,05.

O coeficiente de variação (CV) foi calculado conforme a equação (6) (Skoog *et al.*, 2006):

$$CV\ \% = \frac{desvio\ padrão\ (s)}{média\ das\ absorbâncias} x\ 100\% \tag{6}$$

O CV é definido como o desvio padrão relativo expresso em porcentagem, sendo uma métrica amplamente utilizada por fornecer uma visão mais clara da variabilidade relativa dos dados em relação à média, especialmente em comparação ao uso isolado do desvio padrão (Skoog *et al*, 2006).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Média das absorbâncias e seus erros associados

Para a avaliação da linearidade do método, como também a determinação dos LD e LQ, foi construída uma curva analítica que abrange uma ampla faixa de massas de *p*-nitrofenol, variando de 0,5 µg a 125,0 µg.

A Figura 9 apresenta os espectros referentes aos padrões da curva analítica a partir de cinco repetições independentes (quintuplicata autênticas), sendo que cada ponto da curva corresponde à média das leituras realizadas em triplicata instrumentais de absorbância (A).

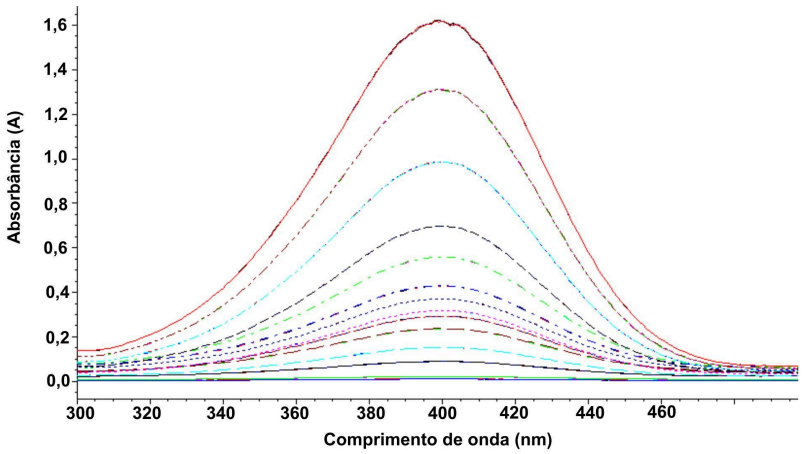


Figura 9 - Absorbância das massas de 0,5 µg a 125,0 µg (própria autora)

A partir das três leituras de absorbância obtidas no espectrofotômetro, calculou-se a média de cada ponto experimental. Com base nesses valores, foi determinado o desvio padrão (s) e o intervalo de confiança (IC), utilizando o software Microsoft Excel. O coeficiente de variação (CV) foi calculado conforme a equação (6). O conjunto de dados obtidos e seus respectivos erros associados para os comprimentos de onda de 400 nm e 415 nm, estão apresentados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Valores de absorbância média para 400 nm, seus desvios padrão, coeficiente de variação e intervalo de confiança para os pontos da curva analítica

***p*NP µg**	**$A_{média}$ (400 nm)**	**s**	**IC 95%**	**CV %**
0,5	0,013	0,003	0,003	26,06
1,0	0,025	0,004	0,004	17,09
5,0	0,082	0,007	0,006	8,08
10,0	0,154	0,007	0,006	4,44
15,0	0,235	0,006	0,005	2,57
20,0	0,304	0,009	0,009	2,86
22,5	0,328	0,015	0,013	4,57
25,0	0,377	0,005	0,005	1,35
30,0	0,426	0,005	0,004	1,15
40,0	0,540	0,015	0,013	2,72
50,0	0,679	0,013	0,012	1,94
75,0	0,989	0,004	0,004	0,36
100,0	1,298	0,017	0,015	1,27
125,0	1,633	0,013	0,011	0,78

Tabela 3 - Valores de absorbância média para 415 nm, seus desvios padrão, coeficiente de variação e intervalo de confiança para os pontos da curva analítica

***p*NP µg**	**$A_{média}$ (415 nm)**	**s**	**IC 95%**	**CV %**
0,5	0,012	0,003	0,003	28,47
1,0	0,023	0,004	0,004	18,40
5,0	0,073	0,006	0,006	8,78
10,0	0,137	0,007	0,006	4,99
15,0	0,209	0,006	0,005	2,83
20,0	0,269	0,008	0,007	2,93
22,5	0,285	0,014	0,012	5,00
25,0	0,331	0,005	0,004	1,46
30,0	0,373	0,004	0,004	1,20
40,0	0,469	0,014	0,012	2,89
50,0	0,589	0,011	0,010	1,89
75,0	0,855	0,003	0,003	0,39
100,0	1,121	0,014	0,012	1,27
125,0	1,410	0,012	0,010	0,82

Para experimentos agrícolas, os coeficientes de variação (CV) são classificados como baixos quando inferiores a 10%, médios entre 10% e 20%, e altos na faixa de 20% a 30% (Couto, 2013). Desse modo, ao analisar as Tabelas 2 e 3, observa-se que, na massa de 0,5 µg, os CVs foram de 26% para 400 nm e 28% para 415 nm, sendo valores altos, o que indica baixa precisão nessas leituras (Couto, 2013). Para a massa de 1,0 µg, os CVs foram de 17% (400 nm) e 18% (415 nm), o que sugerem uma precisão razoável. A partir da massa de 5,0 µg, todos os dados apresentaram CVs classificados como baixos, indicando uma alta precisão. Esses resultados indicam preliminarmente que as leituras obtidas nas duas massas mais baixas podem não ser reprodutíveis, possivelmente por estarem próximas ao limite de detecção do equipamento e, consequentemente, fora da faixa linear da curva analítica.

5.2. Regressão linear e faixa de linear dinâmica

Com base nos valores apresentados nas Tabelas 2 e 3, foram construídos dois gráficos de Absorbância (nm) versus Massa (µg), conforme ilustrado nas Figuras 10 e 11. Para o comprimento de onda de 400 nm, a equação da reta obtida foi $y = 0,0128 x + 0,0305$, enquanto para 415 nm a equação foi $y = 0,0110 x + 0,0304$. Em ambas as regressões lineares, o coeficiente de determinação foi $R^2 = 0,999$, atendendo ao critério estabelecido pela Resolução RDC nº 166/2017 da Anvisa, que recomenda valores de R^2 superiores a 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.

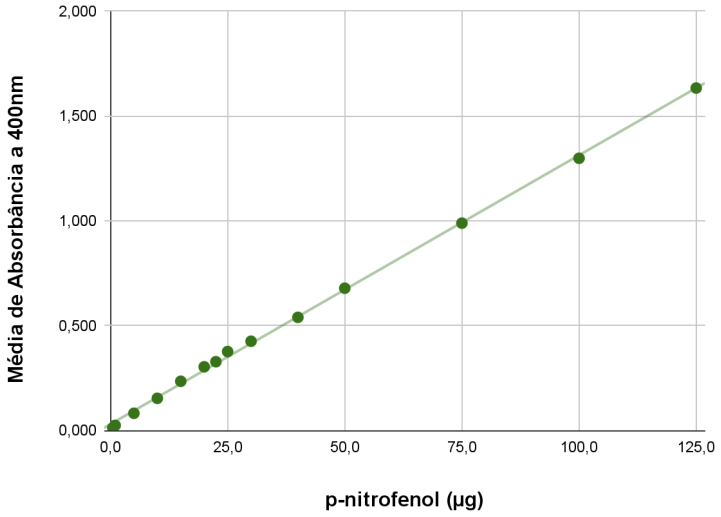


Figura 10 - Gráfico de Absorbância versus massa de *p*NP a 400 nm

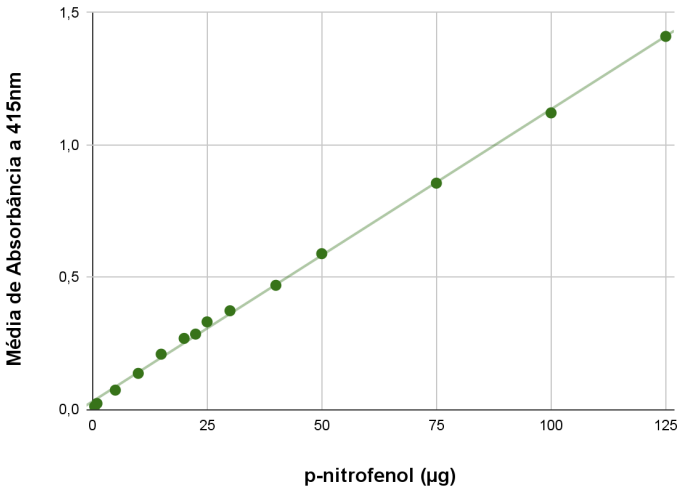


Figura 11 - Gráfico de Absorbância versus massa de *p*NP a 415 nm

Mesmo apresentando um excelente coeficiente de determinação (R^2), a relação linear simples (y = ax + b) é válida apenas dentro de um intervalo específico de concentrações, conhecido como faixa linear dinâmica (Ribani *et al.*, 2004). Para uma melhor visualização da linearidade e da sua eventual perda, foram desenhadas as Figuras 12 e 13, que representam a resposta relativa (RR) em função da massa, em escala logarítmica. As RR foram calculadas conforme a equação (1) e estão apresentadas nas Tabelas 4 e 5. A partir desses valores, determinaram-se as medianas de 0,015 (400 nm) e de 0,013 (415 nm) para definir a linha central do gráfico. Com base nessas linhas centrais, estabeleceu-se uma faixa de aceitação de 80 a 120%, em conformidade com os critérios da RDC nº 166/2017 da Anvisa para

experimentos biológicos, com o objetivo de avaliar a adequação dos dados à faixa de trabalho aceitável (Brasil, 2017).

Tabela 4 - Valores para a faixa linear dinâmica a 400 nm

*p*NP µg	A $_{média}$	Log10	RR
0,5	0,013	-0,301	0,026
1,0	0,025	0,000	0,025
5,0	0,082	0,699	0,016
10,0	0,154	1,000	0,015
15,0	0,235	1,176	0,016
20,0	0,304	1,301	0,015
22,5	0,328	1,352	0,015
25,0	0,377	1,398	0,015
30,0	0,426	1,477	0,014
40,0	0,540	1,602	0,013
50,0	0,679	1,699	0,014
75,0	0,989	1,875	0,013
100,0	1,298	2,000	0,013
125,0	1,633	2,097	0,013

Tabela 5 - Valores para a faixa linear dinâmica a 415 nm

*p*NP µg	A $_{média}$	Log10	RR
0,5	0,012	-0,301	0,024
1,0	0,023	0,000	0,023
5,0	0,073	0,699	0,015
10,0	0,137	1,000	0,014
15,0	0,209	1,176	0,014
20,0	0,269	1,301	0,013
22,5	0,285	1,352	0,013
25,0	0,331	1,398	0,013
30,0	0,373	1,477	0,012
40,0	0,469	1,602	0,012
50,0	0,589	1,699	0,012
75,0	0,855	1,875	0,011
100,0	1,121	2,000	0,011
125,0	1,410	2,097	0,011

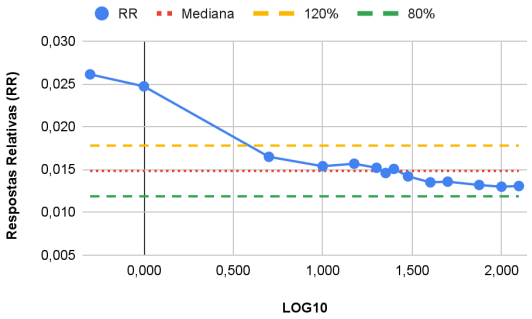


Figura 12 - Faixa Linear Dinâmica a 400 nm

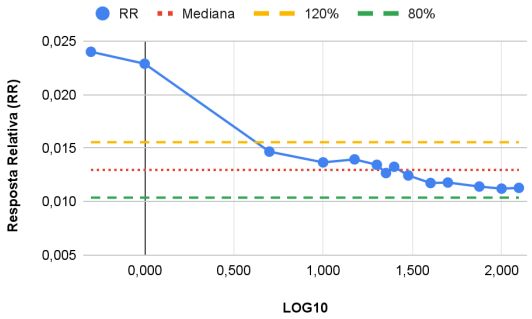


Figura 13 - Faixa Linear Dinâmica a 415 nm

A partir dos gráficos nas Figuras 12 e 13, observa-se de forma mais evidente que os dois primeiros pontos extrapolam a faixa de tolerância da linearidade dinâmica, sugerindo possíveis desvios relacionados a limitações instrumentais. Esse comportamento reforça a hipótese de que as massas de 0,5 µg e 1,0 µg encontram-se abaixo do LQ do equipamento.

Por outro lado, os demais pontos da curva, inclusive em valores mais elevados, permaneceram dentro da faixa linear dinâmica, atendendo aos critérios estabelecidos para a faixa de trabalho em experimentos biológicos. Assim, mesmo com o aumento das concentrações, verifica-se que o método mantém a linearidade da curva de regressão, demonstrando adequação para a quantificação da atividade da enzima β-glicosidase em uma ampla faixa de massa.

5.3. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Para a determinação dos LD e LQ, foram adotados dois métodos, um baseado na avaliação visual e outro utilizando a equação estimada pela RDC nº 166/2017 (Brasil, 2017).

No método visual, analisou-se o comportamento das bandas de absorbância em menores massas, como a de 0,5 µg (Figura 14) e 1,0 µg (Figura 15). Em ambos os espectros, observou-se elevada dispersão entre as quintuplicatas autênticas, e até mesmo entre as triplicatas instrumentais, o que justifica os altos valores de CV apresentados para essas massas. Embora os valores de leituras tenham baixa reprodutividade, é possível identificar a formação de bandas, indicando sinal produzido pelo *p*NP, estando dentro do limite de detecção do equipamento.

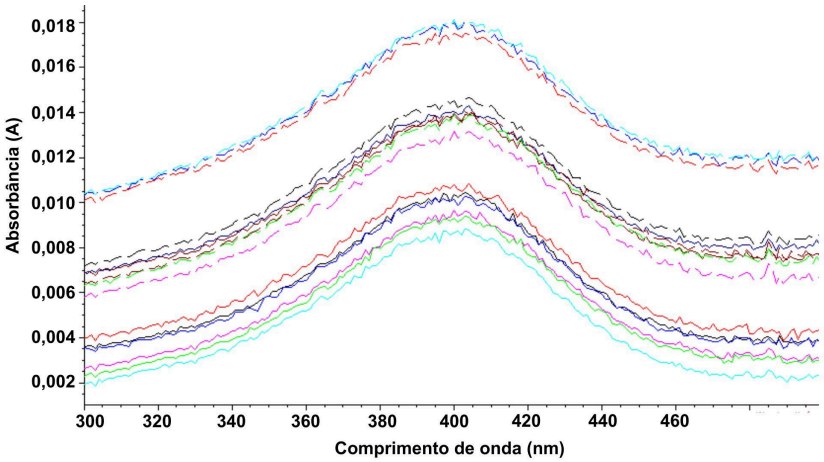


Figura 14 - *p*NP de 0,5 µg

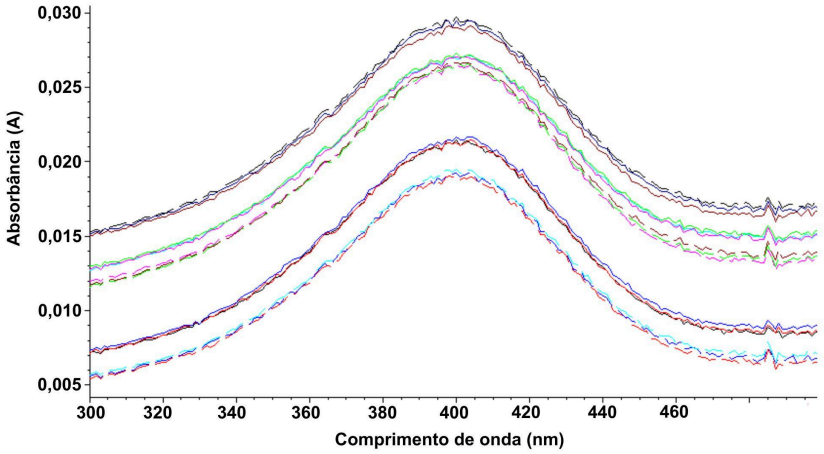


Figura 15 - *p*NP de 1,0 µg

Em contrapartida, ao analisar o espectro correspondente à massa de 5,0 µg (Figura 16), observa-se a formação de uma banda bem definida, com menor dispersão entre as replicatas. Esse resultado indica que a partir dessa massa o método é capaz de quantificar de forma reprodutível o sinal característico do *p*-nitrofenol, diferentemente dos espectros anteriores.

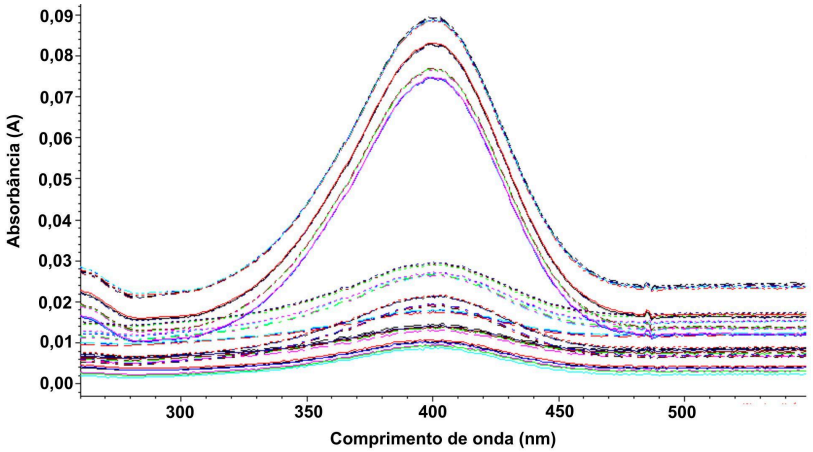


Figura 16 - *p*NP de 5,0 µg

Para a determinação dos LD e LQ pelas equações (2) e (3), primeiro foi necessário calcular o desvio padrão residual (σ). Optou-se usar o desvio residual por ser um parâmetro que reflete de forma mais precisa a variabilidade real do método ao longo da curva analítica, especialmente nos valores próximos ao LD e LQ. Dessa forma, ele fornece uma estimativa mais robusta da sensibilidade do método e de seus limites operacionais.

Para o cálculo, inicialmente determinou-se o valor de y estimado (ŷ) para cada ponto da curva, utilizando a equação da reta (y = ax + b), onde a e b correspondem à inclinação e ao intercepto obtidos pela regressão linear, e x representa a massa de *p*-nitrofenol. A partir dos valores estimados, subtraiu-se a absorbância experimental medida, obtendo-se os resíduos (equação 4). Os resíduos calculados estão apresentados nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6 - Valores para o cálculo de resíduos a 400 nm

y medido	y estimado (ŷ)	Resíduo de y
0,013	0,037	-0,024
0,025	0,043	-0,019
0,082	0,095	-0,012
0,154	0,159	-0,005
0,235	0,223	0,012
0,304	0,287	0,017
0,328	0,319	0,009
0,377	0,351	0,026
0,426	0,415	0,011
0,540	0,543	-0,004
0,679	0,672	0,007
0,989	0,992	-0,003
1,298	1,313	-0,015
1,633	1,633	0,000

Tabela 7 - Valores para o cálculo de resíduos a 415 nm

y medido	y estimado (ŷ)	Resíduo de y
0,012	0,035	-0,024
0,023	0,041	-0,019
0,073	0,086	-0,012
0,137	0,141	-0,004
0,209	0,196	0,013
0,269	0,251	0,018
0,285	0,279	0,006
0,331	0,306	0,025
0,373	0,362	0,012
0,469	0,472	-0,003
0,589	0,582	0,006
0,855	0,858	-0,003
1,121	1,134	-0,014
1,410	1,410	0,000

A partir dos resíduos obtidos, calcularam-se seus desvios padrões residuais (σ) conforme a equação (5). Com esses valores, foi possível determinar o LD e LQ (Tabela 8 e 9) utilizando as equações (2) e (3).

Tabela 8 - LD e LQ em 400 nm

σ	LD (µg)	LQ (µg)
0,015	3,83	11,62

Tabela 9 - LD e LQ em 415 nm

σ	LD (µg)	LQ (µg)
0,015	4,40	13,35

Os resultados calculados indicam que, na faixa de leitura de 400 nm, a massa de aproximadamente 4,0 µg representa o limite mínimo em que o equipamento consegue detectar o sinal do *p*-nitrofenol, enquanto aproximadamente 12,0 µg corresponde ao limite mínimo para uma quantificação confiável. Para a leitura em 415 nm, os limites encontrados foram de aproximadamente 4,0 µg para detecção e, aproximadamente, 13,0 µg para quantificação.

A partir desses valores, é preciso atestar a precisão e exatidão nos pontos próximos do LD e LQ. Para isso, analisou-se 4 amostras de solos em triplicatas autênticas, obtendo-se os valores de absorbância (A), as quais calculou-se a média entre elas. A atividade enzimática foi determinada através das equações das retas obtidas pelas regressões lineares de 400 nm e 425 nm, substituindo o *y* pelos valores de absorbância experimentais e isolando o *x*. Os resultados foram apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Valores de absorbância, concentração e coeficiente de variação das amostras

Amostra	$A_{média}$ (400 nm)	Massa (µg *p*NP/g.h)	CV	$A_{média}$ (415 nm)	Massa (µg *p*NP/g.h)	CV
1	0,163	10,33	1,57	0,130	8,98	0,73
2	0,370	26,47	6,03	0,288	23,34	6,23
3	0,094	4,93	11,44	0,075	4,01	13,31
4	0,024	-0,52	-31,24	0,013	-1,56	-17,31

Na amostra 3 não foi possível quantificar a atividade da enzima, pois o valor se apresentou acima do LD, mas abaixo do LQ, ambos estabelecidos matematicamente. Além disso, o alto valor de CV (11,44%) confirma a baixa precisão entre as replicatas. Nesta amostra, portanto, pode-se apenas detectar esta enzima, mas não a quantificá.

A amostra 4 apresentou resultado de *p*NP negativo, o que indica que, mesmo emitindo sinal, não foi possível detectar nem quantificar esta enzima na amostra. Por outro lado, a amostra 2 apresentou valores intermediários na curva analítica, permitindo a quantificação com precisão.

A amostra 1 possui valores de concentrações próximos aos LQ estabelecidos matematicamente, contudo ainda abaixo deles, apresentando um valor de CV considerado adequado (< 10%). No entanto, se considerarmos os LD e LQ oriundos do método visual (0,5 e 5,0 µg respectivamente), estas duas amostras

teriam a enzima quantificada. Considerando que ambos os valores de CV estavam abaixo de 10%, conclui-se que os valores matemáticos de LD e LQ estão muito conservadores e que os valores visuais estão mais coerentes estatisticamente.

5.4. Homocedasticidade

Além disso, conforme estabelece a RDC nº 166/2017, para a avaliação completa da linearidade é necessário plotar um gráfico de dispersão dos resíduos e, a partir dele, realizar a análise da homocedasticidade (Brasil, 2017). Essa etapa é essencial pois a avaliação da homocedasticidade se baseia no comportamento dos resíduos e pressupõe que a variabilidade absoluta (desvio padrão) dos valores de y permaneça constante ao longo de toda a faixa de concentrações do analito (Sanagi *et al.*, 2010).

Utilizando os valores dos resíduos apresentados nas Tabelas 6 e 7, foram construídos os gráficos de dispersão (Figuras 17 e 18) para essa análise.

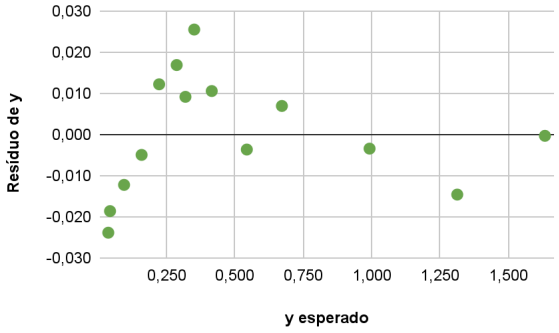


Figura 17 - Gráfico de dispersão de resíduos a 400 nm

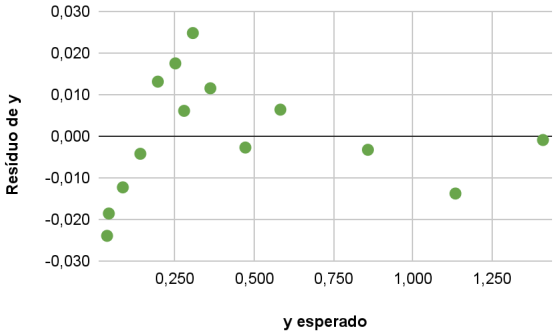


Figura 18 - Gráfico de dispersão de resíduos a 415 nm

Como pode ser observado, os resíduos estão distribuídos de forma aleatória ao redor da linha central, sem apresentar tendências ou padrões sistemáticos. Essa distribuição indica que o tamanho dos resíduos permanece aproximadamente uniforme à medida que a massa (x) aumenta e que os valores estão normalmente distribuídos em torno de zero, atendendo ao critério de homocedasticidade (Van Loco *et al.*, 2002).

6. CONCLUSÕES

Ao realizar um levantamento bibliográfico, pôde-se compreender os princípios da metodologia de quantificação da β-glicosidase, seus parâmetros relevantes e os fatores que afetam a determinação da atividade enzimática, além de traçar uma linha cronológica acerca da evolução do método. Com isso, compilou-se todas as informações necessárias para a plena compreensão da metodologia, facilitando sua implementação em qualquer laboratório. Ressalta-se a necessidade de padronização do uso de unidades de concentração para pesquisas futuras, a fim de minimizar ambiguidades na interpretação dos resultados.

A validação preliminar realizada possibilitou atestar que o método em estudo é seletivo, linear e homocedástico, apresentando coeficiente de determinação elevado (R^2 = 0,999). Além disso, foram definidos e documentados os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), tanto por via experimental quanto por cálculos matemáticos, conforme a resolução nº 166/2017 da Anvisa. Pelo método visual, verificou-se que o espectrofotômetro detecta sinais de *p*-nitrofenol abaixo de 0,5 µg, enquanto o cálculo matemático resultou em LD aproximado de 4,0 µg (400 nm e 415 nm). Para o limite de quantificação, estimou-se visualmente um valor inicial de 5,0 µg, ao passo que os cálculos matemáticos resultaram em 11,62 µg (400 nm) e 13,35 µg (415 nm). A partir da quantificação das amostras, observou-se que os valores calculados de LD e LQ apresentam caráter mais conservador, enquanto os valores visuais são mais representativos e coerentes estatisticamente.

Dessa maneira, garante-se a viabilidade para estudos posteriores quanto a precisão e exatidão do método com a utilização de amostras. Todos os dados foram devidamente documentados possibilitando o uso dessas informações e limites para futuros estudos e demonstrações de resultados quanto a quantificação da atividade enzimática da β-glicosidase. Espera-se que esse trabalho contribua para a disseminação do conhecimento fundamental e base da metodologia, mitigando dúvidas acerca das mudanças de parâmetros e omissão de uso de tolueno, contribuído para a produção de um procedimento operacional padrão para o uso de outros estudantes participantes do laboratório AQQUA.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ACOSTA-MARTÍNEZ, V.; PÉREZ-GUZMÁN, L.; VENUM, 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, v. 2, p. 194–250, 2021. ASA. DOI: https://doi.org/10.1002/9780891189831.ch11

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. DOI: http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162017000300018.

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. DOI: 10.12691/jaem-5-1-4.

BANDICK, A. K.; DICK, R. P. **Field management effects on soil enzyme activities.** Soil Biology and Biochemistry, v. 31, n. 11, p. 1471–1479, 1999. DOI: https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00051-6.

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.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017.** Dispõe sobre a validação de métodos analíticos. Diário Oficial da União: Brasília, DF, 25 jul. 2017. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2017/rdc0166_24_07_2017.html. Acesso em: 26 maio de 2025.

BREMNER, J. M.; TABATABAI, M. A.. **Use of p-nitrophenyl phosphatase for assay of soil phosphatase activity .** In *Soil Bd. Biochem*, v. 1, 1969.

BUAN, I. J. A.; DULDULAO, D. J. C. **Microwave-assisted synthesis of para-nitrophenol using calcium nitrate.** Oriental Journal of Chemistry, v. 37, n. 1, p. 1–5, 2021. Disponível em: https://bit.ly/3bqBa9R. Acesso em 16 de junho de 2025.

CAIRNS, K., ESEN, A**. β-Glucosidases**. Cell Mol Life Sci, v. 67, n. 20, 2010. DOI: 10.1007/s00018-010-0399-2. PMID: 20490603; PMCID: PMC11115901.

CHAER, G. M.; MENDES, I. C.; DANTAS, O. D.; MALAQUIAS, J. V.; JUNIOR, F. B. R.; OLIVEIRA, M. I. L. **Evaluating C trends in clayey Cerrado Oxisols using a four-quadrant model based on specific arylsulfatase and β-glucosidase activities.** Applied Soil Ecology, v. 183, 2023. DOI: https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2022.104742.

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. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e24022.

DENG, S.; POPOVA, I. **Carbohydrate hydrolases.** In: Dick, R. P. Methods of soil enzymology. Madison: Wiley, p. 185–209, 2015. DOI: https://doi.org/10.2136/sssabookser9.c9.

EIVAZI, F.; TABATABAI, M. A. **Glucosidases and galactosidases in soils.** Soil Biology and Biochemistry, v. 20, n. 5, p. 601–606, 1988. DOI: https://doi.org/10.1016/0038-0717(88)90141-1.

EIVAZI, F.; TABATABAI, M. A. **Factors affecting glucosidase and galactosidase activities in soils.** In *Sod Bid. Btochrm*, v. 22, n. 7, 1990.

ESEN, A. **Handbook of food enzymology.** New York, CRC Press, 2003.

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. DOI: **https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2023.110363**.

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. DOI: https://doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33n4p12.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **Keep soil alive, protect soil biodiversity – Global Symposium on Soil Biodiversity**. Proceedings. Rome 2021. DOI: https://doi.org/10.4060/cb7374en

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.** XXV ENPÓS, 2023.

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. DOI: https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.10.003.

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. DOI: 10.1080/00380768.1973.10432524.

HINOJOSA, M. B.; CARREIRA, J. A.; GARCÍA-RUÍZ, R.; DICK, R. P. **Soil moisture pre-treatment effects on enzyme activities as indicators of heavy metal-contaminated and reclaimed soils.** Soil Biology and Biochemistry, v. 36, n. 10, p. 1559–1568, 2004. DOI: https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.07.003.

IUPAC. **Enzymes.** In: IUPAC Compendium of Chemical Terminology, 5. ed. International Union of Pure and Applied Chemistry, 2025. Online version 5.0.0. DOI: 10.1351/goldbook.E02159.

IUPAC. **Photocatalysis.** International Union of Pure and Applied Chemistry, 2021. Disponível em: https://iupac.org/materialschemistryedu/energy/photocatalysis/. Acesso em: 21 jun. 2025.

IUPAC. **Carboidratos**. In: IUPAC Compendium of Chemical Terminology, 5. ed. International Union of Pure and Applied Chemistry, 2025. Online version 5.0.0. DOI:https://doi.org/10.1351/goldbook.C00820

KLOSE, S.; TABATABAI, M. A. **Response of glycosidases in soils to chloroform fumigation.** Biology and Fertility of Soils, v. 35, n. 4, p. 262–269, 2002. DOI: https://doi.org/10.1007/s00374-002-0463-7.

LISBOA, B. B.; VARGAS, L. K.; DA SILVEIRA, A. O.; MARTINS, A. F.; SELBACH, P. A. **Indicadores microbianos de qualidade do solo em diferentes sistemas de manejo**. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 36, n. 1, p. 33–44, 2012. DOI: https://doi.org/10.1590/S0100-06832012000100004.

LOPES, A. A. C.; DE SOUSA, D. M. G.; JÚNIOR, F. B. R.; MENDES, I. C.. **Air-drying and long-term storage effects on β-glucosidase, acid phosphatase and arylsulfatase activities in a tropical Savannah Oxisol**. Applied Soil Ecology, v. 93, p. 68–77, 2015. DOI: 10.1016/j.apsoil.2015.04.001.

MARSONA, B. M.; CONCENTINOA, V.; JUNKERTA; A. M.; FACHIA, M. M.; VILHENAA; PONTAROLOA; Roberto. **Validation of analyticial methods in a pharmaceutical quality system: an overview focused on HPLC methods**. Quim. Nova, v. 43, n. 8, p. 1190-1203, 2020. DOI: https://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170589

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

MENDES, I. C., SOUSA, D. M. G. de, JUNIOR, F. B. dos R.; LOPES, A. A. de C. **Bioanálise de solo: como acessar e interpretar a saúde do solo.** Circular Técnica, Planatina, DF, 2018.

MENDES, I. C.; CHAER, G. M.; DE SOUSA, D. M. G.; JUNIOR, F. B. R.; DANTAS, O. D.; DE OLIVEIRA, M. I. L.; LOPES, A. A. DE C.; DE SOUZA, L. M. Bioanálise de solo: a mais nova aliada para a sustentabilidade agrícola. Revista Nacional da Produção Científica e Tecnológica, v. 8, p. 1–11, 2020. Disponível em: http://www.npct.com.br.

MENDES, I. C.; CHAER, G. M.; JUNIOR, F. B. dos R.; DANTAS, O. D.; MALAQUIAS, J. V.; DE OLIVEIRA, M. I. L.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. **Soil Bioanalysis (BoilBio): A Sensitive, Calibrated, and Simple Assessment of Soil Health for Brazil.** Soil Health Series, vol. 3, 2024. DOI: https://doi.org/10.1002/9780891187448.ch10

MENDES, I de C.. 2025. Standard operating procedure for soil enzyme activities – β-glucosidases, arylsulfatase, N-acetyl-β-glucosaminidase, dehydrogenase, phosphomonoesterases. Rome, FAO. DOI: https://doi.org/10.4060/cd2462en

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

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. DOI: https://doi.org/10.1016/j.procbio.2023.03.035.

NANNIPIERI, P.; TRASAR-CEPEDA, C.; DICK, R. P. **Soil enzyme activity: a brief history and biochemistry as a basis for appropriate interpretations and meta-analysis.** Biology and Fertility of Soils, v. 54, n. 1, p. 11–19, 2018. DOI: https://doi.org/10.1007/s00374-017-1245-6.

OLIVEIRA, A. S. de. **Glomalina e enzimas em solo de áreas de uso de forrageiro no bioma Caatinga.** 2022. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2022.

PACHECO, T. F.; MENDES, T. D. **Guia prático para caracterização de enzimas.** Embrapa Agroenergia, 2021. ISSN 2177-4439

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. DOI: https://doi.org/10.3390/agronomy11122410.

PASSOS, S. R.; JUNIOR, F. B. dos R.; RUMJANEK, N. G.; MENDES, I. de 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.

RIBANI, M.; BEATRIZ, C.; BOTTOLI, G.; COLLINS, C. H.; SALES, I. C.; JARDIM, F. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos**. Química Nova, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004. DOI: https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017.

SANAGI, M. M.; NASIR, Z.; LING, S. L.; HERMAWAN, D.; IBRAHIM, W. A. W.; NAIM, A. A. **A practical approach for linearity assessment of calibration curves under the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) Guidelines for an in-house validation of method of analysis.** Journal of AOAC International, vol. 93, n. 4, 2010.

SILVA, A. B. da; 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. DOI: https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2025.151050.

SILVEIRA, A. P. D.; ABREU, M. F.; CANTARELLA, H.; ZAMBROSI, F. C. B. **Determinação da atividade de enzimas em solo.** Campinas: Secretaria da Agricultura e Abastecimento, Instituto Agronômico, 2022. Disponível em: https://lab.iac.sp.gov.br/Publicacao/ProtocoloIACEnzimasSolosAbril2022.pdf. Acesso em: 23 jun. 2025.

SKUJIŅŠ, J. **Enzymes in soil**. In: BURNS, R. G. (ed.). Soil enzymes. New York: Academic Press, 1978. p. 371–414.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Fundamentos de química analítica. 8. ed. São Paulo: Thomson, 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, e021009, 2021. DOI: https://doi.org/10.36783/18069657rbcs20210109.

SYEDD-LÉON, M. **Spectrophotometric analysis of p-nitrophenol in alkaline medium: spectral properties and ionization behavior.** Journal of Analytical Chemistry, v. 75, n. 2, p. 165–172, 2020. DOI: 10.1134/S1061934820020074.

TABATABAI, M. A. **Soil enzymes.** In: BURNS, R. G.; DICK, R. P. (ed.). Enzymes in the environment: activity, ecology, and applications. New York: Marcel Dekker, 2002. p. 567–596.

TABATABAI, M. A. **Soil Enzymes**. Methods of Soil Analysis: Part 2 Microbiological and Biochemical Properties, p. 775-833. Madison, WI: The American Society of Agronomy. 1994. DOI: https://doi.org/10.2136/sssabookser5.2.c37

TURNER, B. L.; HOPKINS, D. W.; HAYGARTH, P. M.; OSTLE, N. **β-glucosidase activity in pasture soils.** Applied Soil Ecology, v. 20, p. 157–162, 2002. DOI: https://doi.org/10.1016/S0929-1393(02)00020-3.

VAN LOCO, J.; ELSKENS, M.; CROUX, C.; BEERNAERT, H. **Linearity of calibration curves: use and misuse of the correlation coefficient. Accreditation and Quality** Assurance, v. 7, n. 7, p. 281–285, 1 jul. 2002. https://doi.org/10.1007/s00769-002-0502-y.

VERCHOT, L. V.; BORELLI, T.. **Application of para-nitrophenol (pNP) enzyme assys in degraded tropical soils.** Soil Biology e Biochemistry, v. 37, p. 625-633, 2005. DOI: doi:10.1016/j.soilbio.2004.09.005.

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

WALLENSTEIN, M. D.; BURNS, R. G. **Ecology of extracellular enzyme activities and organic matter degradation in soil: a complex community-driven process.** In: SHUKLA, G.; VARMA, A. (ed.). Soil enzymology, p. 35–55, 2011.

XIONG, Z.; LAI, B.; YUAN, Y.; CAO, J.; YANG; P., ZHOU, Y. **Degradation of p-nitrophenol (PNP) in aqueous solution by a micro-size Fe0/O3 process (mFe0/O3): Optimization, kinetic, performance and mechanism**. Chemical Engineering Journal, v. 302, p. 137-145, 2016. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.05.052.