

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Instituto de Química

CURSO DE BACHALERADO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA

LAURA BOTELHO BOMFIM

EFEITO DE UM PREBIÓTICO COMERCIAL NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE SOLOS AGRÍCOLAS

BRASÍLIA - DF

2025

LAURA BOTELHO BOMFIM

EFEITO DE UM PREBIÓTICO COMERCIAL NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE SOLOS AGRÍCOLAS

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

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Fernanda Vasconcelos de Almeida

BRASÍLIA - DF

2025

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela força, saúde e serenidade para perseverar nos momentos mais desafiadores desta jornada.

À minha orientadora, Prof.ª Dr.ª Fernanda Vasconcelos de Almeida, por sua orientação dedicada, pelas inúmeras oportunidades de aprendizado e por acreditar em mim desde o início. Sua confiança, apoio e generosidade foram essenciais para meu crescimento acadêmico e pessoal.

À Universidade de Brasília (UnB), ao Instituto de Química e ao laboratório AQQUA, pela infraestrutura, suporte técnico e ambiente de aprendizado que tornaram possível a execução desta pesquisa.

À parceria com a iniciativa AgriforLife, que contribuiu com dados valiosos e reforçou a conexão entre ciência e prática agrícola.

Às minhas amigas e companheiras de pesquisa, Catarina Medeiros Martins e Bianca Silva Perinazzo, sob a mesma orientação, que estiveram ao meu lado desde o início das pesquisas, quando ainda eram iniciações científicas, e com quem compartilhei experiências, dificuldades e conquistas. Nossos projetos individuais, que começaram juntos, cresceram lado a lado até se tornarem nossos TCCs.

À minha família, pelo amor incondicional e por sempre acreditarem em mim. Em especial, aos meus pais Eliete Araújo Botelho e Eugênio Pacelli Mendes Bomfim, por serem meu alicerce e por todo o suporte, carinho e incentivo ao longo dessa caminhada.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu mais sincero agradecimento.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais por todo amor, apoio e incentivo incondicional ao longo da minha vida acadêmica, e às minhas amigas de pesquisa, com quem compartilhei tantos aprendizados, desafios e conquistas desde o início da nossa trajetória.

RESUMO

As enzimas do solo são, em sua maioria, secretadas pelos microrganismos que compõem a biomassa microbiana, os quais liberam essas biomoléculas para degradar substratos complexos. As enzimas podem ser intracelulares (associadas a fração viva da microbiota) ou extracelulares (estabilizadas na matriz e nos agregados do solo por longos períodos de tempo), e são fundamentais para a decomposição da matéria orgânica do solo (MOS) e para a ciclagem de nutrientes, influenciando diretamente a saúde e a fertilidade do solo. Em 2020, a EMBRAPA incorporou a atividade enzimática como componente biológico das análises de rotina de solos por meio da Tecnologia BioAS, suprindo lacunas das análises físico-químicas tradicionais. Com base nessa tecnologia, investigou-se o efeito de um prebiótico comercial à base de extrato de microalgas, chamado Biobalance da empresa espanhola Biorizon Biotech, sobre as atividades de β-glicosidase e arilsulfatase em solos de cultivo de morango, por meio de experimentos de campo em Piedade (SP), Pouso Alegre (MG) e Senador Amaral (MG). Após duas aplicações do produto (2 L/ha) e coletas de solo realizadas antes do tratamento e 90 dias após a primeira aplicação, foram quantificadas as atividades de β-glicosidase e arilsulfatase com base nos métodos clássicos de Tabatabai, hoje padronizados pela EMBRAPA e adotados pela FAO. O método envolve a hidrólise dos substratos específicos de cada enzima, sob pH, temperatura e tempo de incubação ideais, liberando p-nitrofenol (PNP). O PNP foi determinado por espectrofotometria a 401, 410 e 420 nm, a partir de uma curva de calibração externa. Os resultados foram então submetidos à análise estatística, calculando-se média, desvio-padrão e coeficiente de variação. Para os 3 solos estudados, os valores de β-glicosidase foram classificados como baixos e os de arilsulfatase, nas mesmas amostras, variaram entre baixos a altos, ambos de acordo com as tabelas de referências da EMBRAPA. Diante dos resultados, várias hipóteses foram levantadas para explicar os desvios observados e a falta de um comportamento consistente entre aplicação do produto e atividade enzimática. A mais plausível refere-se ao método de amostragem e ao modo de armazenamento adotados, que privilegiam o acesso à "memória" do solo, conforme preconizado pela EMBRAPA, mas não atendem ao objetivo de avaliar as condições do solo o mais próximo do momento da coleta. Além disso, este trabalho evidenciou a importância de um delineamento experimental rigoroso em campo capaz de gerar dados analíticos confiáveis. Por isso, recomenda-se a elaboração de Procedimentos Operacionais Padrão (POPs) destinados aos futuros parceiros envolvidos, garantindo a padronização das etapas de aplicação, coleta e processamento das amostras.

Palavras-chave: Atividade enzimática. Prebiótico. Solo. Tecnologia BioAS. Bioindicadores.

ABSTRACT

Soil enzymes are mostly secreted by microorganisms that make up the microbial biomass, which release these biomolecules to degrade complex substrates. These enzymes can be intracellular (associated with the living fraction of the microbiota) or extracellular (stabilized in the soil matrix and aggregates for long periods), and play a key role in soil organic matter (SOM) decomposition and nutrient cycling, directly influencing soil health and fertility. In 2020, EMBRAPA incorporated enzyme activity as a biological component of routine soil analyses through the BioAS Technology, filling gaps in traditional physicochemical analyses. Based on this technology, this study evaluated the effect of a commercial prebiotic based on microalgae extract, called Biobalance (Biorizon Biotech, Spain), on β-glucosidase and arylsulfatase activities in strawberry-cultivated soils through field experiments in Piedade (SP), Pouso Alegre (MG), and Senador Amaral (MG), Brazil. After two product applications (2 L/ha) and soil sampling before treatment and 90 days after the first application, enzyme activities were quantified according to the classical methods of Tabatabai, standardized by EMBRAPA and adopted by FAO. The method involves the hydrolysis of specific substrates under optimal pH, temperature, and incubation time, releasing p-nitrophenol (PNP), which was quantified by spectrophotometry at 401, 410, and 420 nm using an external calibration curve. For the three soils studied, β-glucosidase values were classified as low, while arylsulfatase values ranged from low to high in the same samples, according to EMBRAPA reference tables. Results showed no consistent pattern between product application and enzyme activity, with high coefficients of variation and some values below the quantification limit. The most plausible explanation relates to the sampling and storage method adopted, which favors access to the soil's "memory," as recommended by EMBRAPA, but does not reflect conditions at the time of sampling. This study highlights the importance of rigorous experimental field design to generate reliable analytical data and recommends developing Standard Operating Procedures (SOPs) to ensure the standardization of application, sampling, and processing stages in future studies.

Key-words: Enzyme activity. Prebiotic. Soil. BioAS Technology. Bioindicators.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição dos componentes em um solo natural preservado, sem histórico de uso agrícola	10
Figura 2 -	Fluxograma dos principais compartimentos da MOS	11
Figura 3 -	Origem das enzimas do solo	15
Figura 4 -	Processo de decomposição dos resíduos vegetais no solo mediado pelas glicosidases	16
Figura 5 -	Ação das fosfatases e arilsulfatases no solo	18
Figura 6 -	Localização das enzimas no compartimento do solo	19
Figura 7 -	Aplicação do Biobalance	
Figura 8 -	Hidrólise de um substrato com a β-glicosidase atuando como catalisador	27
Figura 9 -	Estrutura do PNG	28
Figura 10 -	Incubação das amostras a 37°C por 1 hora	29
Figura 11 -	Filtração das amostras	30
Figura 12 -	Estrutura do PNS	31
Figura 13 -	Filtração da curva de calibração da arilsulfatase	32
Figura 14 -	Curva de calibração β-glicosidase em 420 nm	33
Figura 15 -	Espectro de absorção do PNP (β-glicosidase)	36
Figura 16 -	Espectro de absorção do PNP (arilsulfatase)	36

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 -	Especificações do Biobalance	23
Tabela 2 -	Produtos agrícolas aplicados em conjunto com o prebiótico em Piedade – SP	25
Tabela 3 -	Produtos agrícolas aplicados em conjunto com o prebiótico em Pouso Alegre – MG	25
Tabela 4-	Produtos agrícolas aplicados em conjunto com o prebiótico em Senador Amaral – MG	25
Tabela 5 -	Preparação das soluções padrão da curva de calibração da β-glicosidase	28
Tabela 6 -	Preparação das soluções padrão da curva de calibração da arilsulfatase	31
Tabela 7 -	Valores de referência para Latossolos Vermelhos argilosos de cerrado, sob cultivos anuais, na camada de 0 cm a 10 cm, utilizando o conceito Fertbio: específica para amostras de solo coletadas na fase de pós-colheita e secas ao ar	34
Tabela 8 -	Atividade enzimática em 401 nm	35
Tabela 9 -	Atividade enzimática em 420 nm (β-glicosidase) e 410 nm (arilsulfatase)	35
Tabela 10 -	Comparação dos coeficientes de variação (CV %)	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AQQUA	Grupo de Automação, Quimiometria e Química Ambiental
CV	Coeficiente de Variação
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
MOS	Matéria Orgânica do Solo
MUB	Modified Universal Buffer (Tampão Universal Modificado)
OR	Osmose Reversa
PGPRs	Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (Rizobactérias Promotoras de Crescimento Vegetal)
PNG	p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo
PNP	p-nitrofenol
PNS	p-nitrofenil sulfato
RPD	Diferença Relativa Percentual (Relative Percent Difference)
THAM	Tris-Hidroximetil-Amino-Metano
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	07
2	**OBJETIVOS**	08
2.1	**Objetivo geral**	08
2.2	**Objetivos específicos**	08
3	**REVISÃO TEÓRICA**	09
3.1	**Definição, componentes e saúde do solo**	09
3.2	**Matéria orgânica do solo**	10
3.3	**Biomassa microbiana**	12
3.4	**Atividade enzimática do solo**	14
3.4.1	β-glicosidase e o ciclo do carbono	16
3.4.2	Arilsulfatase e o ciclo do enxofre	17
3.4.3	Tecnologia BioAS	18
3.5	**Biofertilizantes e bioestimulantes**	20
3.5.1	Prebióticos agrícolas	21
3.5.2	Microalgas	21
3.5.3	Biobalance	23
4	**MATERIAIS E MÉTODOS**	24
4.1	**Aplicação do prebiótico e amostragem**	24
4.2	**Quantificação da enzima β-glicosidase**	26
4.3	**Quantificação da enzima arilsulfatase**	30
4.4	**Análise dos resultados**	32
5	**RESULTADOS E DISCUSSÕES**	34
6	**CONCLUSÃO**	39
	BIBLIOGRAFIA	41

1 INTRODUÇÃO

A qualidade do solo é fundamental para garantir a sustentabilidade e a produtividade da agricultura, especialmente diante do crescimento populacional e da degradação dos recursos naturais (Karaca *et al.*, 2010). Os processos biológicos são fundamentais para a manutenção da saúde do solo, que, por sua vez, favorecem o desenvolvimento de plantas e animais saudáveis. Sendo assim, um solo biologicamente ativo sustenta lavouras mais resilientes, capazes de produzir alimentos em quantidade e qualidade adequadas para atender às demandas de uma população crescente (Mendes *et al.*, 2020).

Para avaliar a qualidade do solo, os bioindicadores são ferramentas extremamente úteis, pois representam atributos ou propriedades biológicas que refletem o estado do ecossistema edáfico e são altamente sensíveis às alterações no ambiente em função de manejos agrícolas (Mendes *et al.*, 2020). Entre os principais bioindicadores, destacam-se a biomassa microbiana, a biodiversidade do solo (incluindo flora e fauna), os microrganismos e a atividade enzimática (Fonseca, 2021).

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) desempenhou um papel pioneiro no Brasil no estudo e quantificação da atividade enzimática em solos brasileiros e lançou em julho de 2020 a Tecnologia BioAs, que incorporou bioindicadores às análises de rotina do solo, preenchendo a lacuna deixada pela ausência do componente biológico nessas análises (Malaquias *et al.*, 2021).

Dentre todas as enzimas presente no solo, os estudos da EMBRAPA demonstraram que a arilsulfatase, do ciclo de enxofre, e a β-glicosidase, do ciclo do carbono, são as mais adequadas para as análises de rotina do solo pelos seguintes motivos: alta sensibilidade para detectar alterações no solo em função do sistema de manejo; estreita relação com a matéria orgânica do solo (MOS) e rendimento de grãos; precisão, coerência e reprodutibilidade nas análises; simplicidade na determinação analítica; não são influenciadas pela aplicação de adubos e calcário; dentre outros (Mendes *et al.*, 2020).

Durante o manejo das culturas, vários produtos agrícolas podem ser utilizados com diferentes objetivos, entretanto há uma crescente preocupação global em substituir os produtos de origem mineral pelos de origem natural. Nesse contexto, os prebióticos agrícolas são um tipo de insumo agrícola utilizado para a melhoria das condições do solo e do crescimento das plantas, e estão sendo cada vez mais estudados e utilizados. São compostos, em sua maioria, por substâncias de origem natural, como extratos vegetais e de algas, ou por minerais

inorgânico, como silício, ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn), que servem de substrato para a atividade dos microrganismos do solo (Alahmad *et al.*, 2023).

Ao contrário dos probióticos e biofertilizantes que adicionam microrganismos vivos diretamente na cultura, o mecanismo de ação dos prebióticos é mais indireto e atuam como substratos que nutrem e modulam a microbiota nativa. Desse modo, o consórcio microbiano enriquecido pelo uso de prebióticos aprimora a comunicação microbiana e a interação simbiótica com as raízes, otimizando a absorção de água e nutrientes pela planta (Alahmad *et al.*, 2024).

Por sua vez, as microalgas apresentam uma rica composição química, incluindo proteínas, carboidratos, vitaminas, ácidos graxos poli-insaturados, pigmentos, macro e micronutrientes, além de moléculas bioativas (Santos *et al.*, 2021). Essa riqueza torna-as uma base promissora para o desenvolvimento de diversos produtos agrícolas, cujos extratos oferecem múltiplos benefícios. Além disso, as microalgas podem ser cultivadas em águas residuais, aproveitando os nutrientes presentes nesses efluentes, como nitrogênio e fósforo, e contribuindo para a remoção de matéria orgânica e outros poluentes. Somam-se a isso sua elevada capacidade de sequestro de carbono e sua alta produtividade, características que as tornam uma alternativa sustentável e eficiente para a agricultura moderna (Ronga *et al.*, 2019).

Considerando o exposto, torna-se evidente a importância de estudos que investiguem a relação entre o uso de bioinsumos, como os prebióticos agrícolas à base de extrato de microalgas, e os bioindicadores de qualidade do solo. A atividade enzimática, por ser um indicador sensível e dinâmico das condições biológicas do solo, assume papel central na avaliação da saúde desse ecossistema, especialmente frente às práticas de manejo sustentável. Assim, compreender como esses insumos influenciam os processos biológicos do solo é fundamental para promover sistemas agrícolas mais resilientes, produtivos e ambientalmente equilibrados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência de um prebiótico comercial, a base de microalgas, nas atividades enzimáticas de solos agrícolas.

2.2 Objetivos específicos

1. Realizar levantamento bibliográfico.
2. Auxiliar no experimento de campo realizado pelos parceiros.
3. Quantificar as enzimas β-glicosidase e arilsulfatase das amostras.
4. Discutir a influência do produto Biobalance na atividade das enzimas β-glicosidase e arilsulfatase.

3 REVISÃO TEÓRICA

3.1 Definição, componentes e saúde do solo

Durante o processo dinâmico de transformação da paisagem, fatores como clima, relevo, material de origem e a ação de organismos vivos promovem a degradação das rochas, dando origem ao solo. Para que esse material seja considerado solo, é necessário que ele seja capaz de sustentar a vida. Quando os organismos passam a interagir com esse substrato, extraindo dele os nutrientes essenciais para seus ciclos biológicos, estabelece-se um ambiente propício à vida. Assim, o solo torna-se um habitat natural, fundamental para a manutenção dos ecossistemas terrestres (Trigueiro, 2019).

Os principais componentes do solo são: os minerais, que constituem a porção sólida inorgânica e definem a textura do solo; a matéria orgânica, resultante da decomposição de animais e vegetais, sendo um componente crucial que terá destaque nas próximas seções; água e ar, presentes na porção porosa do solo. Além disso, o solo também é composto por organismos vivos e, por mais que não sejam citados diretamente como um de seus componentes clássicos, é uma condição essencial para ser assim definido (Trigueiro, 2019).

O solo é um sistema complexo que oferece suporte físico, supre as plantas com água e nutrientes, é influenciado pela matéria orgânica e pela atividade biológica, tem propriedades físicas como estrutura e porosidade que regulam o fluxo de água e ar, tampona ambientes ácidos e oferece proteção (Molina, 2017). A capacidade do solo de desempenhar essas funções é fundamental para a produtividade das lavouras e por isso é considerado a matéria prima do trabalho agrícola (Trigueiro, 2019).

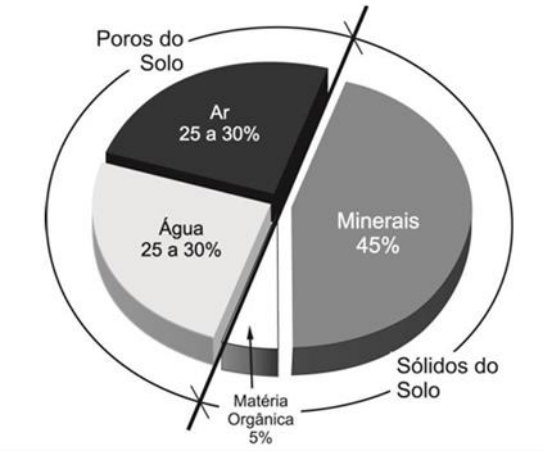


Figura 1 – Distribuição dos componentes em um solo natural preservado, sem histórico de uso agrícola (Molina, 2017)

Um solo saudável oferece inúmeros benefícios tanto para o agricultor quanto para o meio ambiente, pois garante maior produtividade e estabilidade a longo prazo, visto que solos degradados não conseguem sustentar a produtividade por muito tempo, e presta importantes serviços ambientais, como o sequestro de carbono. Além disso, apresenta maior resiliência a estresses, como a seca, maior eficiência na ciclagem e disponibilidade de água e nutrientes, maior estabilidade dos agregados, favorecendo a infiltração de ar e água, e por fim, atividade biológica intensa e ativa contribui para a biorremediação de pesticidas (Mendes *et al.*, 2020).

3.2 Matéria orgânica do solo

A matéria orgânica do solo (MOS) é composta por uma variedade de elementos químicos, entre os quais se destacam o carbono (C), hidrogênio (H), oxigênio (O), nitrogênio (N), fósforo (P) e enxofre (S), conhecidos como CHONPS. Dentre eles, o carbono é o mais abundante e frequentemente utilizado como parâmetro para estimar o estoque e avaliar a dinâmica da MOS (Silva *et al.*, 2023).

Os compartimentos da MOS são divididos em matéria viva e matéria morta. A matéria viva inclui os organismos do solo, seus metabólitos e os exsudatos radiculares liberados pelas plantas. Já a matéria morta é composta por resíduos de origem vegetal e animal em diferentes estágios de decomposição, como palhada e esterco, além de substâncias húmicas (mistura complexa, amorfa e estável de compostos orgânicos) que representam a principal forma de carbono no solo. Também fazem parte da matéria morta as substâncias não humificadas (macromoléculas que funcionam como fonte de nutrientes para os microrganismos), e o carbono

solúvel em água (CSA), constituído por compostos de baixa massa molar e natureza polar, capazes de complexar elementos tóxicos e nutrientes (Silva *et al.*, 2023).

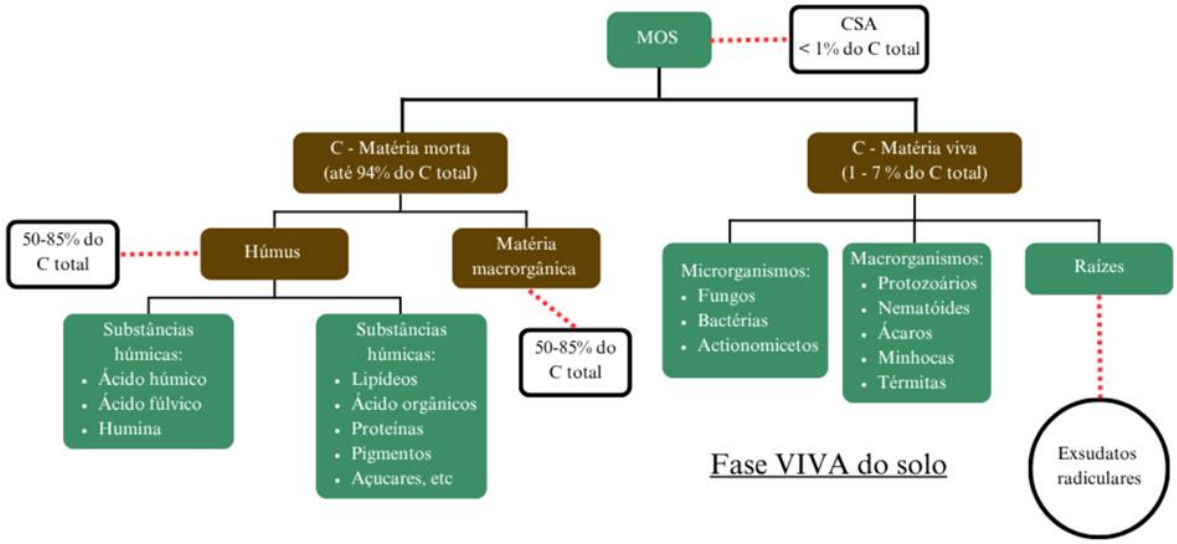


Figura 2 – Fluxograma dos principais compartimentos da MOS (Adaptado de Silva *et al.*, 2023).

Os principais processos relacionados à matéria orgânica do solo (MOS) são de natureza química, física e biológica. As plantas não conseguem absorver diretamente os compostos orgânicos complexos presentes na MOS, sendo necessária sua transformação em formas minerais assimiláveis (Trigueiro, 2019). Nesse contexto, destaca-se a mineralização, um processo bioquímico no qual microrganismos e enzimas do solo convertem compostos orgânicos em nutrientes inorgânicos, como amônio (NH_4^+), nitrato (NO_3^-), fosfatos (PO_4^{3-}) e sulfatos (SO_4^{2-}) (Molina, 2017).

Outro processo químico fundamental é a retenção de cátions, principalmente em solos tropicais, onde a fração mineral, composta de óxidos de ferro (Fe) e alumínio (Al), possui baixa capacidade de troca de cátions (CTC). Nesses ambientes, a MOS atua como a principal fonte de cargas negativas, promovendo a retenção de nutrientes essenciais como cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}), cobre (Cu^{2+}), zinco (Zn^{2+}), manganês (Mn^{2+}) e potássio (K^+). A MOS também desempenha um papel importante no tamponamento da acidez do solo, evitando desequilíbrios nutricionais e danos por elementos tóxicos. Além disso, contribui para aumentar a disponibilidade de fósforo (P) ao reduzir sua fixação na fração mineral. Por fim, a relação carbono/nitrogênio (C/N) da MOS serve como indicador da taxa de liberação de nitrogênio para plantas e organismos do solo (Silva *et al.*, 2023).

3.3 Biomassa microbiana

A microbiota do solo é composta por uma ampla e diversa comunidade de microrganismos que integram a fração orgânica viva, também denominada biomassa microbiana (C-BM). Essa biomassa inclui organismos microscópicos como algas, nematoides, protozoários, bactérias, actinobactérias e fungos, que desempenham papéis essenciais nos processos bioquímicos do solo. De modo geral, para serem classificados como microrganismos, esses seres devem apresentar dimensões inferiores a 0,1 mm (Silva *et al.*, 2023).

Os microrganismos desempenham um papel essencial na decomposição da matéria orgânica do solo ao metabolizarem macromoléculas, como proteínas e carboidratos, presentes em resíduos vegetais e animais (Trigueiro, 2019). Entre esses organismos, destacam-se os chamados microrganismos eficazes (do inglês, *Effective Microbes – EMs*), capazes de transformar a MOS em nutrientes assimiláveis pelas plantas (Naik *et al*, 2019). Esses nutrientes são então absorvidos e incorporados aos tecidos vegetais, compondo raízes, caules, folhas, flores e frutos. À medida que essas estruturas se desenvolvem e completam seus ciclos, retornam ao solo, liberando novamente os nutrientes que continham e contribuindo, assim, para o fechamento do ciclo da matéria orgânica (Trigueiro, 2019).

A atividade enzimática do solo está diretamente associada à biomassa microbiana, uma vez que os microrganismos representam a principal fonte de enzimas presentes nesse ambiente. Essas enzimas atuam como catalisadores em diversas reações bioquímicas essenciais, como a decomposição da matéria orgânica, a ciclagem de nutrientes e a estruturação do solo (Costa e Campos, 2022). Muitas moléculas orgânicas presentes no solo, como a celulose, hemicelulose e quitina, são grandes demais para serem transportadas diretamente para o interior das células microbianas. Por isso, os microrganismos liberam enzimas extracelulares que atuam fora da célula para hidrolisar (quebrar) esses substratos maiores e complexos em moléculas menores e mais simples, como oligossacarídeos ou monossacarídeos (por exemplo, glicose). Essas moléculas simples se tornam então prontamente disponíveis para o consumo microbiano como fontes de carbono (C) e energia (Sobucki *et al.*, 2021).

Entre os processos biológicos que contribuem para a formação e a estabilidade dos agregados do solo, destacam-se a ação de hifas fúngicas, que iniciam a agregação, e a adesão de compostos como polissacarídeos e glomalina, uma glicoproteína produzida por fungos

micorrízicos arbusculares (FMA) que favorecem a coesão e estabilidade desses agregados (Silva *et al.*, 2023).

Diversos microrganismos do solo estabelecem interações benéficas com as plantas, especialmente na rizosfera, a zona ao redor das raízes onde há intensa troca de compostos entre planta e microbiota. Os exsudatos radiculares, ricos em açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos, servem como fonte de energia e nutrientes para os microrganismos, favorecendo sua atividade (Silva *et al.*, 2023). Nesse ambiente, destacam-se as rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (do inglês, *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria – PGPR*), capazes de estimular diretamente o desenvolvimento das plantas por meio da síntese de fitormônios, produção de enzimas degradadoras de compostos orgânicos complexos e aumento da absorção de nutrientes (Alahmad *et al.*, 2023).

Os microrganismos eficazes (EMs), incluindo PGPRs, vêm sendo amplamente estudados e aplicados como biofertilizantes devido à sua capacidade de contribuir para a sustentabilidade agrícola. Entre os principais mecanismos de ação estão a fixação biológica de nitrogênio (N_2), a solubilização de fósforo (P) e potássio (K), a liberação de micronutrientes, a produção de exopolissacarídeos e a transformação da matéria orgânica. Tais processos não apenas favorecem o crescimento vegetal, mas também melhoram a estrutura e a retenção hídrica do solo. Além disso, esses microrganismos produzem compostos bioativos, como vitaminas, hormônios e enzimas, que promovem o desenvolvimento vegetal, além de agentes de biocontrole que aumentam a resistência das plantas a estresses bióticos e abióticos (Naik *et al.*, 2019).

As interações ecológicas positivas, como mutualismo e simbiose, ou negativas, como o antagonismo contra patógenos, também contribuem para a produtividade das culturas (Naik *et al.*, 2019). Exemplos notáveis incluem *Pseudomonas fluorescens*, eficazes no controle de patógenos do solo, e os lipopeptídeos produzidos por Bacillus, que atuam como potentes agentes de biocontrole (Brugman *et al.*, 2018).

A atividade da microbiota do solo é regulada por uma variedade de fatores, como a umidade, temperatura, pH, aeração, disponibilidade de água e de substratos orgânicos, além da textura do solo, presença de metais pesados, agentes xenobióticos e práticas de manejo. As práticas de manejo inadequadas podem comprometer significativamente a atividade biológica do solo, reduzindo a diversidade microbiana e a quantidade de matéria orgânica, o que afeta diretamente a fertilidade e o equilíbrio dos processos ecológicos do solo (Silva *et al.*, 2023).

Por isso também, a atividade microbiana pode ser utilizada como bioindicador de qualidade e saúde do solo (Alahmad *et al.*, 2023).

3.4 Atividade enzimática do solo

O solo é frequentemente descrito como um sistema vivo, onde ocorrem diversas atividades bioquímicas fundamentais, mediadas por processos enzimáticos. As enzimas do solo são proteínas com alta especificidade e atuam como catalisadores, acelerando reações bioquímicas essenciais à manutenção e funcionalidade do ecossistema, sem serem consumidas ou alteradas permanentemente no processo. A atividade enzimática do solo é resultado de um compilado de fatores bióticos e abióticos (Tabatabai *et al.*, 2002).

Quanto à sua origem, as enzimas do solo são originadas principalmente da biomassa microbiana, embora também possam ser provenientes de resíduos vegetais e animais (Tabatabai, 1994). Os microrganismos são amplamente reconhecidos como a principal fonte de atividade enzimática no solo devido à sua elevada biomassa, intensa atividade metabólica e ciclos de vida curtos. Essas características permitem a produção e liberação contínua de quantidades significativas de enzimas extracelulares, superando a contribuição de plantas e animais nesse aspecto (Tabatabai *et al.*, 2002).

Sendo assim, as enzimas no solo podem se apresentar em diferentes formas, estados e localizações. Elas podem ser intracelulares, integrando a biomassa microbiana viva, ou extracelulares, estando separadas das células que as produziram (Tabatabai *et al.*, 2002). Entre as extracelulares, distinguem-se as exoenzimas, liberadas ativamente por células vivas, e as endoenzimas, liberadas durante a decomposição de células. Além disso, essas enzimas podem estar livres ou associadas a constituintes celulares, adsorvidas a partículas orgânicas ou minerais, ou ainda complexadas com substâncias húmicas, o que influencia sua estabilidade e atividade no solo (Tabatabai, 1994).

Em geral, a fração de enzimas livres na solução do solo representa uma porção muito menor em comparação àquelas associadas a outros componentes, pois os mecanismos como adsorção, microencapsulação e ligação ajudam a proteger a atividade das enzimas extracelulares (Karaca *et al.*, 2010).

Uma parte significativa das enzimas do solo é composta pelas chamadas enzimas acumuladas, também denominadas abióticas, por estarem associadas à fração não viva do solo. Essas enzimas se acumulam e podem persistir ativamente no solo por longos períodos, uma vez que são protegidas da degradação pelos mecanismos de adsorção descritos acima (Tabatabai, 1994). A Figura 3 mostra as diferentes origens das enzimas e as fases do solo em que são encontradas.

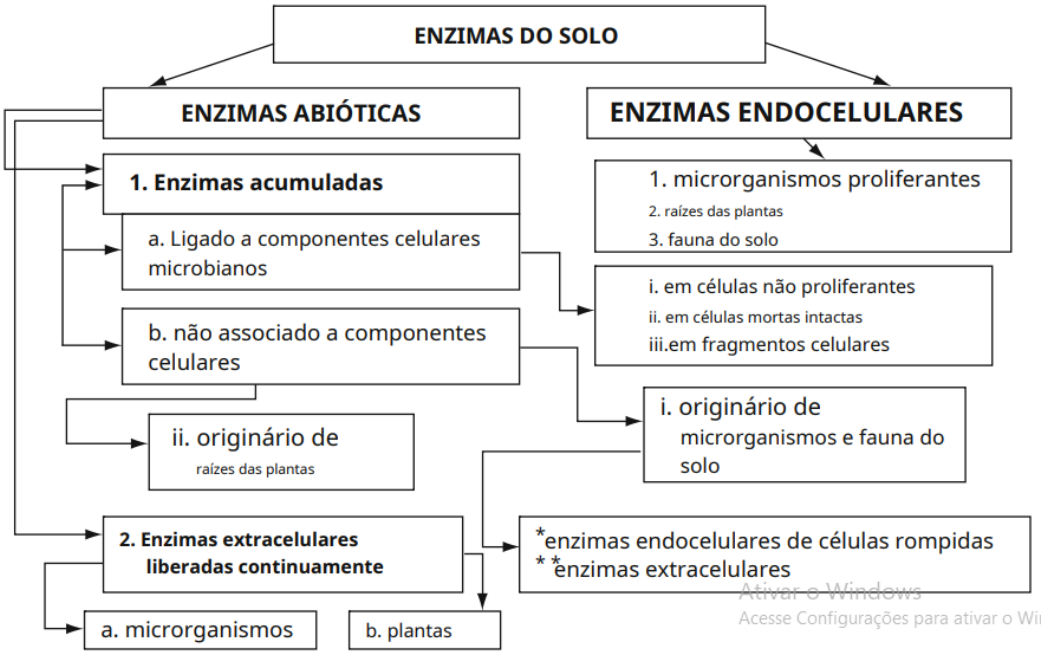


Figura 3 – Origem das enzimas do solo (Adaptado de Karaca *et al.*, 2010).

As principais reações e processos que as enzimas participam são a ciclagem de nutrientes, decomposição da matéria orgânica, biodegradação de poluentes e controle de patógenos de plantas. Na ciclagem de nutrientes e na degradação da matéria orgânica, elas atuam diretamente nos ciclos biogeoquímicos de elementos essenciais como carbono (C), nitrogênio (N), fósforo (P) e enxofre (S). Os compostos orgânicos complexos contendo esses elementos são transformados em formas inorgânicas assimiláveis pelas plantas, que posteriormente os devolvem ao ambiente ou à atmosfera em diferentes formas químicas. Com o tempo, esses elementos retornam ao solo, completando o ciclo natural (Sobucki *et al.*, 2021).

As celulases são enzimas centrais no ciclo do carbono, sendo importantes para a quebra da celulose. Dentre elas, destaca-se a β-glicosidase, que atua na etapa final da despolimerização desse polissacarídeo. No ciclo do nitrogênio, as principais enzimas responsáveis pela hidrólise de compostos de N orgânicos são as proteases e ureases. Além disso, os processos de

nitrificação e desnitrificação também são mediados por enzimas específicas. No ciclo do fósforo, as fosfatases são fundamentais para a mineralização dos compostos de P orgânicos. Por fim, as sulfatases catalisam reações de hidrólise de compostos de S orgânicos, como a arilsulfatase que participa da hidrólise de ésteres de S orgânicos, contribuindo para a manutenção do ciclo do enxofre no solo (Sobucki *et al.*, 2021).

Além das enzimas envolvidas nos ciclos biogeoquímicos principais, outras enzimas também possuem papeis importantes como as desidrogenases, que participam da oxidação da matéria orgânica no solo, transferindo H de substratos para aceptores, e a catalase, que está envolvida no metabolismo oxidorredutor microbiano (Sobucki *et al.*, 2021).

3.4.1 β-glicosidase e o ciclo do carbono

As β–glicosidases são enzimas pertencentes ao grupo das glicosidases ou glicosídeo hidrolases, que possuem o número de classificação EC 3.2.1, conforme a *International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB),* e catalisam a hidrólise de ligações O- e S-glicosídicas de diferentes glicosídeos (Deng e Popova, 2011). Mais especificamente, a β-glicosidase catalisa a hidrólise da celobiose, um dissacarídeo de glicose solúvel em água, atuando diretamemte nas ligações β(1→4) e liberando β-D-glicose, como mostra a Figura 4 (Silva e Kaschuk, 2025).

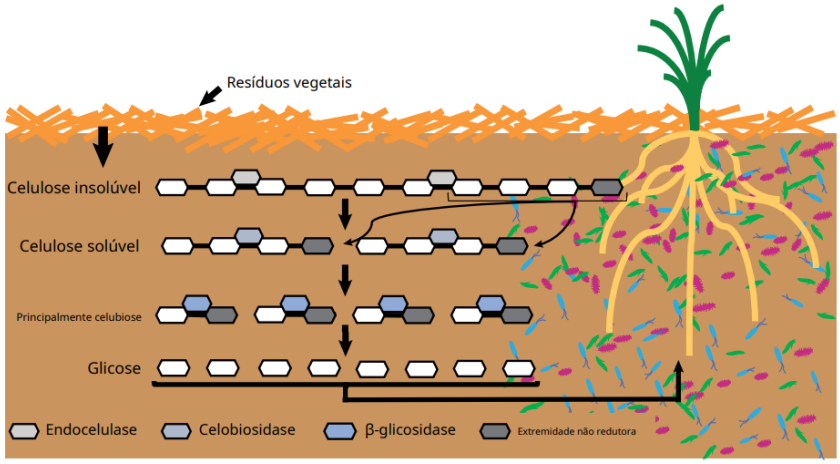


Figura 4 – Processo de decomposição dos resíduos no solo mediado pelas glicosidases (Sobucki *et al.*, 2021)

A glicose liberada é de importância vital, pois essas moléculas servem como carbono lábil e fontes de energia para sustentar a vida microbiana no solo (Mendes, 2025). Os microrganismos que utilizam essa glicose, por sua vez, desempenham papéis cruciais no

controle da disponibilidade de outros nutrientes e na promoção do crescimento vegetal (Sobucki *et al.*, 2021).

As glicosidases são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em microrganismos, animais e plantas (Tabatabai, 1994). Em solos, a atividade da β-glicosidase é frequentemente mais dominante do que a de outras glicosidases como α-glucosidases e α- e β-galactosidases (Eivazi; Tabatabai, 1988).

A importância das glicosidases para o ciclo do carbono reside na sua função essencial de quebrar açúcares complexos derivados da celulose em formas simples que podem ser utilizadas pelos microrganismos, facilitando assim a reciclagem de carbono a partir da biomassa vegetal e servindo simultaneamente como um indicador sensível da atividade biológica e da saúde do solo (Sobucki *et al.*, 2021).

3.4.2 Arilsulfatase e o ciclo do enxofre

As arilsulfatases são enzimas que pertencem à classe das hidrolases de ésteres sulfúricos (EC 3.1.6, segundo IUBMB). Essas enzimas catalisam a hidrólise de ésteres sulfato que possuem radicais aromáticos, como os ésteres fenólicos do ácido sulfúrico. Durante a reação, ocorre a clivagem da ligação O–S, resultando na liberação de um fenol, um próton (H^+) e um íon sulfato (SO_4^{2-}), conforme representado na Equação 1 (Tabatabai; Bremner, 1970).

$$R.O.SO^{3-} + H_2O \rightarrow R.OH + H^+ + SO_4^{2-} \qquad \text{Equação 1}$$

No ciclo do enxofre, a arilsulfatase desempenha um papel crucial na mineralização do enxofre orgânico, visto que as plantas não conseguem assimilar o enxofre nessa forma. Os ésteres sulfato são considerados a forma mais lábil de enxofre orgânico e, por serem prontamente hidrolisados por essas enzimas, convertem-se rapidamente em sulfato inorgânico (Klose *et al.*, 2011).

Ao contrário das β-glicosidases, que atuam na degradação da celulose, liberando formas de carbono assimiláveis pelos microrganismos, as arilsulfatases catalisam reações que liberam enxofre na forma inorgânica, tornando-o disponível tanto para as plantas quanto para os microrganismos do solo, como mostra a Figura 5 (Sobucki *et al.*, 2021).

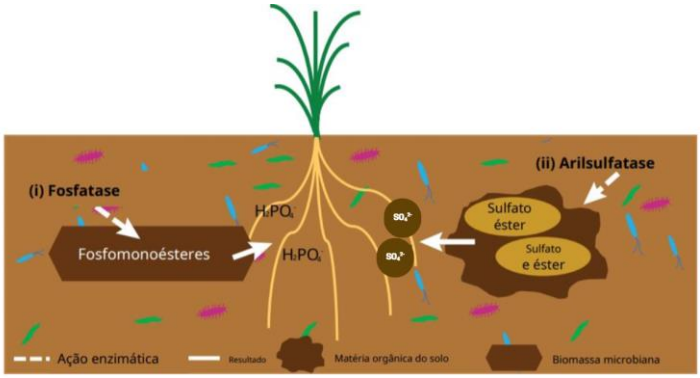


Figura 5 – Ação das fosfatases e arilsulfatases no solo (Sobucki *et al.*, 2021)

A arilsulfatase está presente em plantas, animais e microrganismos, sendo estes últimos reconhecidos como a principal fonte dessa enzima no solo. Sua atividade tem sido particularmente associada à biomassa fúngica, uma vez que os fungos, ao contrário das bactérias, tendem a acumular maiores quantidades de ésteres sulfato (Mendes, 2025).

A atividade de arilsulfatase no solo reflete a contribuição combinada de organismos vivos e de enzimas extracelulares acumuladas no ambiente edáfico, compondo a fração abiótica. Essas enzimas extracelulares, mesmo após a morte celular de organismos de gerações passadas, permanecem ativas por estarem protegidas da degradação, principalmente devido à sua adsorção em partículas de argila e matéria orgânica (Mendes, 2025).

3.4.3 Tecnologia de Bioanálise do Solo (BioAS)

Em 2020, a EMBRAPA lançou uma nova tecnologia de análise de rotina do solo, incorporando o componente biológico, até então ausente, com o objetivo de preencher lacunas observadas em situações em que os resultados das análises físico-químicas convencionais não correspondiam à real condição de produtividade e saúde do solo (Malaquias *et al.*, 2021).

A tecnologia baseia-se na quantificação da atividade de duas enzimas do solo: β-glicosidase e arilsulfatase. A escolha dessas enzimas se deve à sua capacidade comprovada de atuar como bioindicadores robustos e eficazes da qualidade do solo. Segundo Mendes e colaboradores (2021), suas principais qualidades incluem:

- Alta sensibilidade e resposta rápida a mudanças no ambiente edáfico;
- Relação direta com a ciclagem de nutrientes e a dinâmica da MOS;
- Correlação significativa com o rendimento de grãos;

• Simplicidade analítica e baixo custo operacional;

• Compatibilidade com o conceito FertBio de amostragem (realizada no pós-colheita e com pré-tratamento por secagem ao ar);

• Estabilidade frente à aplicação de adubos e corretivos como o calcário;

• Associação com diversos outros atributos microbiológicos do solo;

• Funcionam como “impressões digitais” dos sistemas de manejo.

Avaliar a atividade enzimática do solo permite “ler” sua memória, pois ele retém não só as enzimas produzidas pela microbiota e pelas plantas vivas, mas também um estoque de enzimas extracelulares de gerações passadas. Elas permanecem estáveis ao se ligar a partículas de argila e à MOS, registrando o histórico de manejos. Como a resposta enzimática a mudanças ambientais é muito mais rápida que a variação nos teores de MOS, que pode levar anos para se manifestar, seu monitoramento oferece um indicador precoce de melhoria biológica (Malaquias *et al.*, 2021). Essa dinâmica pode ser observada na Figura 6.

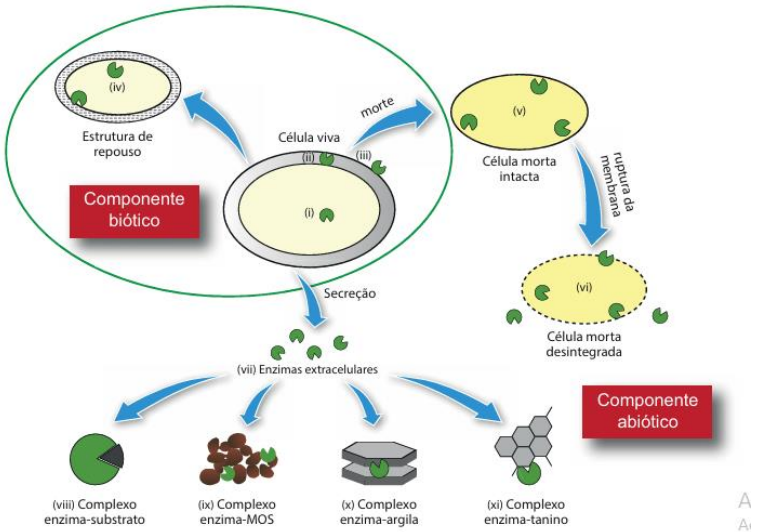


Figura 6 – Localização das enzimas no compartimento do solo (Malaquias *et al.*, 2021)

Vários fatores modulam a atividade das enzimas do solo. O pH do meio afeta diretamente a atividade das enzimas, de modo que, fora da sua faixa ótima, a enzima perde eficiência ou mesmo deixa de funcionar. Temperaturas muito elevadas podem desnaturar a enzima. A umidade do solo é essencial, visto que as reações hidrolíticas em que as enzimas participam ocorrem em meio aquoso. A disponibilidade de matéria orgânica e de substratos específicos regula a síntese enzimática: quando um composto já se encontra em formas simples prontamente assimiláveis (por exemplo, aminoácidos livres), os microrganismos diminuem a

produção das enzimas responsáveis pela degradação dos seus compostos mais complexos. O mesmo é válido para teores baixos de MOS (Sobucki *et al*., 2021).

Variações sazonais e climáticas influenciam fortemente a atividade enzimática do solo, mesmo em áreas bem manejadas. A intensidade de chuvas e as oscilações de temperatura alteram a umidade e estimulam ou inibem a microbiota, modificando as taxas de produção enzimática. Em situações de encharcamento, o excesso de água muda o potencial redox e o pH do solo, prejudicando a função de várias enzimas (Tabatabai, 1994). Por isso, é importante que cada região passe por estudos específicos, como já ocorreu no Cerrado, para desenvolver suas próprias tabelas de interpretação de atividade enzimática (Mendes *et al.*, 2018).

3.5 Biofertilizantes e bioestimulantes

Bioestimulantes e biofertilizantes são categorias distintas de produtos agrícolas que visam melhorar o crescimento das plantas e a saúde do solo, frequentemente utilizados como alternativas ou complementos aos fertilizantes químicos sintéticos para promover uma agricultura mais sustentável (Miranda *et al.*, 2024). Esses termos são frequentemente utilizados como sinônimos, embora possuam definições distintas segundo a legislação brasileira.

O Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) define biofertilizantes como produtos à base de substâncias orgânicas ou componentes ativos obtidos de microrganismos, ou resultantes de sua atividade, incluindo também derivados vegetais e animais. Esses produtos devem atuar direta ou indiretamente sobre as plantas, promovendo o aumento da produtividade ou a melhoria da qualidade (Brasil, 2020). Por outro lado, bioestimulantes são definidos como produtos formulados com substâncias naturais de variadas composições, que podem ser aplicadas ao solo, às sementes ou às plantas, com o objetivo de estimular o crescimento radicular, a germinação, o equilíbrio hormonal e o desenvolvimento vegetal, contribuindo assim para o aumento da produção e da qualidade das culturas (Brasil, 2020). Na literatura, os biofertilizantes também aparecem como uma subcategoria de bioestimulantes (Du Jardin, 2015).

O principal objetivo dos biofertilizantes é fornecer ou aumentar a disponibilidade de nutrientes para as plantas no solo. Em geral, esses produtos contêm microrganismos vivos que, ao colonizarem a rizosfera ou o interior das plantas, promovem o crescimento vegetal por meio do incremento na absorção e no fornecimento de nutrientes (Silva *et al.*, 2019). Seus mecanismos de ação envolvem, principalmente, a fixação biológica de nitrogênio, a solubilização

de fósforo e potássio, bem como a transformação da matéria orgânica do solo, entre outros processos benéficos à nutrição e ao desenvolvimento vegetal (Miranda *et al.*, 2024).

O mecanismo de ação dos bioestimulantes é complexo e multifacetado, abrangendo tanto a fisiologia direta da planta quanto a modulação do ambiente do solo e de seu microbioma. Uma de suas diferenças em relação aos biofertilizantes é a sua ação nos processos metabólicos e fisiológicos das plantas, otimizando o seu funcionamento, como o estimulo do crescimento e desenvolvimento hormonal, através de fitohormônios (Du Jardin, 2015).

3.5.1 Prebióticos agrícolas

Os prebióticos são insumos complementares compostos por ingredientes de fontes naturais, como ácidos húmicos e fúlvicos, hidrolisados de proteínas, algas marinhas, extratos vegetais e de algas, materiais orgânicos complexos, quitosana e outros biopolímeros aplicados com o objetivo de melhorar as condições do solo e estimular o crescimento vegetal, além de apresentarem potencial para contribuir com o sequestro de carbono (C) (Alahmad *et al.*, 2023).

Embora não sejam microrganismos vivos, como os probióticos e biofertilizantes, atuam como substrato ou suporte metabólico para a microbiota nativa, favorecendo a multiplicação e a atividade de microrganismos benéficos. Dessa forma, buscam modular a comunidade microbiana do solo, promovendo efeitos positivos na saúde do solo e na produtividade das plantas (Alahmad *et al.*, 2024).

Prebióticos são frequentemente associados às categorias de biofertilizantes ou bioestimulantes, e podem ser aplicados em conjunto para potencializar os efeitos de ambos, mas, dependendo de sua composição e modo de ação, podem não se enquadrar formalmente em nenhuma delas, conforme os critérios do Programa Nacional de Bioinsumos. Atualmente, o MAPA ainda não possui uma definição oficial para prebióticos, o que evidencia a necessidade de maiores avanços científicos e estudos específicos que esclareçam seus mecanismos de ação e seus potenciais efeitos sobre o solo e as plantas (Brasil, 2020).

3.5.2 Microalgas no uso agrícola

As microalgas são organismos fotossintetizantes microscópicos, podendo apresentar-se sob forma unicelular ou colonial. Atuando como verdadeiras “micro fábricas biológicas”,

elas utilizam dióxido de carbono (CO_2) e luz solar para realizar a fotossíntese, produzindo oxigênio (O_2) e gerando uma ampla gama de produtos de valor agregado, com potencial aplicação nos setores agrícola, energético, alimentício e ambiental (Kapoore *et al.*, 2021).

O uso de microalgas na produção de insumos agrícolas desponta como uma alternativa inovadora e sustentável, com potencial para contribuir significativamente para sistemas produtivos mais eficientes e ambientalmente responsáveis. No entanto, sua viabilização em escala comercial ainda enfrenta desafios importantes, especialmente relacionados aos custos de produção, à complexidade dos sistemas de cultivo e à necessidade de avanços científicos e tecnológicos (Chabilli *et al.*, 2024).

Embora a pesquisa sobre o uso de microalgas na produção de bioprodutos agrícolas ainda esteja em estágio inicial e enfrente diversos desafios técnicos e econômicos, seu potencial promissor tem motivado intensos esforços de investigação, devido às múltiplas vantagens agronômicas, ambientais e sustentáveis associadas à sua aplicação (Chabilli *et al.*, 2024).

Dentre as principais vantagens ambientais do uso de extratos de microalgas na agricultura, destaca-se a redução da dependência de insumos químicos, uma vez que seus extratos são geralmente biodegradáveis e menos tóxicos do que os produtos de origem mineral (Santos *et al.*, 2021). Além disso, por serem organismos fotossintéticos, as microalgas possuem alta capacidade de sequestro de carbono, podendo capturar quantidades significativas de CO_2, muitas vezes superiores às de plantas e árvores, e assim, contribuir para a mitigação das mudanças climáticas (Miranda *et al.*, 2024). Outro aspecto relevante é a possibilidade de cultivo em águas residuais, o que não apenas reduz os custos de produção, mas também auxilia no tratamento de efluentes, promovendo um ciclo mais sustentável (Ronga *et al.*, 2019).

As microalgas promovem diversos benefícios para as plantas devido à sua rica composição bioquímica. Elas são uma fonte abundante de metabólitos de alto valor agregado, como proteínas, aminoácidos (ex.: arginina, triptofano, prolina), enzimas, pigmentos, ácidos graxos poli-insaturados, polissacarídeos (como os β-glucanos), vitaminas e fitohormônios (auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico, brassinosteroides e poliaminas). Esses compostos são capazes de estimular diversos processos fisiológicos nas plantas, como a respiração celular, fotossíntese, síntese de ácidos nucleicos e absorção de íons. Além disso, os extratos de microalgas funcionam como um biofertilizante de liberação lenta, fornecendo nutrientes de forma

gradual ao solo e favorecendo a saúde do sistema radicular e da microbiota edáfica (Braun; Colla, 2022).

Em relação ao solo, produtos à base de microalgas podem estimular o crescimento de microrganismos benéficos, como rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPRs) e fungos micorrízicos, além de favorecer a presença de antagonistas naturais de patógenos no solo. Esses efeitos contribuem para a intensificação da atividade enzimática e para o aumento da diversidade metabólica microbiana. Adicionalmente, esses insumos auxiliam na acumulação de matéria orgânica e na melhoria da capacidade de retenção de água, promovendo um ambiente edáfico mais saudável e funcional (Alahmad *et al.*, 2024).

As microalgas também apresentam vantagens significativas do ponto de vista produtivo e comercial. Em termos de produtividade, destacam-se por gerar biomassa em níveis 10 a 100 vezes superiores aos das culturas agrícolas convencionais, o que as torna altamente eficientes como matéria-prima (Silva *et al.*, 2019). Além disso, oferecem grande flexibilidade de cultivo, podendo ser produzidas em terras não agricultáveis e em sistemas diversos (abertos e fechados), o que possibilita maior controle das condições de produção e padronização da qualidade dos extratos. Esse aspecto é particularmente vantajoso em comparação às macroalgas, cuja composição química pode variar com fatores sazonais e climáticos (Kapoore *et al.*, 2021).

3.5.3 Biobalance

O produto investigado neste estudo é o Biobalance, um prebiótico comercial desenvolvido pela empresa espanhola Biorizon Biotech. Trata-se de uma solução de aminoácidos formulada a partir de um concentrado hidrolítico de microalgas, obtido por meio da tecnologia TrieTech®, patenteada pela própria empresa (Biorizon Biotech, 2025). A composição do produto encontra-se apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 – Especificações do Biobalance (Adaptado de Biorizon Biotech, 2025)

Composição	% em peso
Nitrogênio total	2,00
Nitrogênio orgânico	2,00
Aminoácido livres	6,00
Propriedades	
pH	5,00
Densidade (Kg/L a 20°C)	1,06
Aminograma qualitativo	
Ácido aspártico, Ácido glutâmico, Alanina, Cistina, Glicina, Histidina, Prolina, Serina, Tirosina, Hidroxiprolina, Hidroxilisina, Asparagina, Fenilalanina, Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Treonina, Triptofano, Valina e Arginina.	

A empresa apresenta duas alegações principais que justificam o uso tecnológico do produto. A primeira refere-se à ação direta sobre as plantas, promovendo a melhoria da fotossíntese, a regulação do equilíbrio hídrico e o aumento da atividade metabólica, especialmente nas rotas do metabolismo secundário. Esses efeitos são atribuídos à presença de compostos fitoestimulantes presentes no extrato de microalgas, tais como carboidratos, ácidos graxos, aminoácidos, polifenóis, poliaminas, fitohormônios e vitaminas (Biorizon Biotech, 2025).

O segundo modo de ação está relacionado à promoção da microbiota rizosférica, caracterizando o produto como um prebiótico. Os hidrolisados de microalgas contidos na formulação estimulam o desenvolvimento de fungos benéficos e bactérias promotoras do crescimento vegetal. Essa interação induz a planta a liberar compostos do metabolismo secundário via exsudatos radiculares, que funcionam como sinais bioquímicos capazes de ativar genes específicos nas bactérias da rizosfera. Como resultado, há maior crescimento microbiano, aumento da fixação biológica do nitrogênio, solubilização de fósforo orgânico e inorgânico, produção de sideróforos, fitohormônios e antibióticos naturais, e ativação de mecanismos de defesa vegetal contra patógenos do solo (Biorizon Biotech, 2025).

O fenômeno desencadeado pela aplicação do Biobalance é conhecido como quimiotaxia, um mecanismo de orientação do movimento bacteriano. Por meio de sensores proteicos na membrana e do batimento de seus flagelos, as bactérias detectam gradientes de concentração de determinadas substâncias e se movem de acordo com eles. Quando o deslocamento ocorre em direção ao aumento da concentração do estímulo, fala-se em quimiotaxia positiva; se as células se afastam do estímulo, caracteriza-se quimiotaxia negativa (Biorizon Biotech, 2025).

4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1 Aplicação do prebiótico e amostragem

A obtenção de uma amostra de solo representativa começa ainda na etapa de amostragem, que deve considerar a uniformidade do local. Na ausência de indícios claros de heterogeneidade, como variações na topografia, tipo de solo ou uso da terra, a amostragem aleatória simples costuma ser adequada. No entanto, quando é possível identificar áreas distintas com características marcadamente diferentes, recomenda-se a adoção de uma amostragem aleatória estratificada, garantindo que cada estrato seja devidamente representado. Deve-se evitar a

amostragem por julgamento, e, quando necessário, pode-se recorrer à formação de amostras compostas para melhorar a representatividade dos dados (Mendes, 2025).

A pesquisa foi conduzida em colaboração com a iniciativa Agriforlife, liderada pelas empresas Agrilife, Casa Bugre e Krilltech, cuja missão é integrar o conhecimento científico às demandas dos produtores rurais, fomentando um agronegócio mais eficiente, lucrativo e sustentável (Agriforlife, 2025). Sendo assim, a aplicação do produto e a amostragem foram feitas pelos seus colaboradores.

O experimento foi conduzido em três cidades distintas do país, Piedade – SP, Pouso Alegre – MG e Senador Amaral – MG. A dosagem das aplicações do Biobalance foi de 2 L/ha e foram aplicados outros produtos agrícolas em conjunto, conforme as Tabelas 2, 3 e 4 para cada região. A primeira aplicação do Biobalance ocorreu uma semana após a inoculação de microrganismos, e a segunda aplicação foi realizada 30 dias após a primeira.

Tabela 2 – Produtos agrícolas aplicados em conjunto com o prebiótico em Piedade – SP

Piedade – SP		
Produto	Dose	n° de plantas
Biológicos		
Schocker	500 g	10000
Profix	200 g	10000
Repetição a cada 60 dias		

Tabela 3 – Produtos agrícolas aplicados em conjunto com o prebiótico em Pouso Alegre – MG

Pouso Alegre – MG		
Produto	Dose	n° de plantas
Verango	250 mL	10000
Algon	500 mL	10000
Humiset	1 L	10000
Biológicos		
Schocker	500 g	10000
Profix	200 g	10000
Repetição a cada 60 dias		
Utilização desde início de 2024		

Tabela 4 – Produtos agrícolas aplicados em conjunto com o prebiótico em Senador Amaral – MG

Senador Amaral – MG		
Produto	Dose	n° de plantas
Auin	300 mL	10000
Capataz	500 mL	10000
Humiset	1 L	10000
Ridomil Bravo	500 mL	10000
Algon	500 mL	10000
Biológicos		
Schocker	500 g	10000
Profix	200 g	10000
Repetição a cada 60 dias		

A primeira coleta de solo (Amostra 1) foi realizada uma semana após a inoculação dos microrganismos e antes da primeira aplicação do Biobalance. Já a segunda coleta (Amostra 2) ocorreu 90 dias após a primeira aplicação e 60 dias após a segunda.

O controle corresponde ao solo que não recebeu aplicação do prebiótico, sendo essencial para a comparação dos efeitos do tratamento. No planejamento, essa amostra deveria ter sido coletada, conforme orientação, no mesmo momento da Amostra 2, uma vez que outros fatores relacionados ao tempo podem influenciar a atividade enzimática independentemente da aplicação do produto. No entanto, devido problemas técnicos durante o experimento, o controle foi coletado com um intervalo superior a 30 dias em relação à Amostra 2. A Figura 7 demonstra, de forma visual, como a aplicação foi realizada.

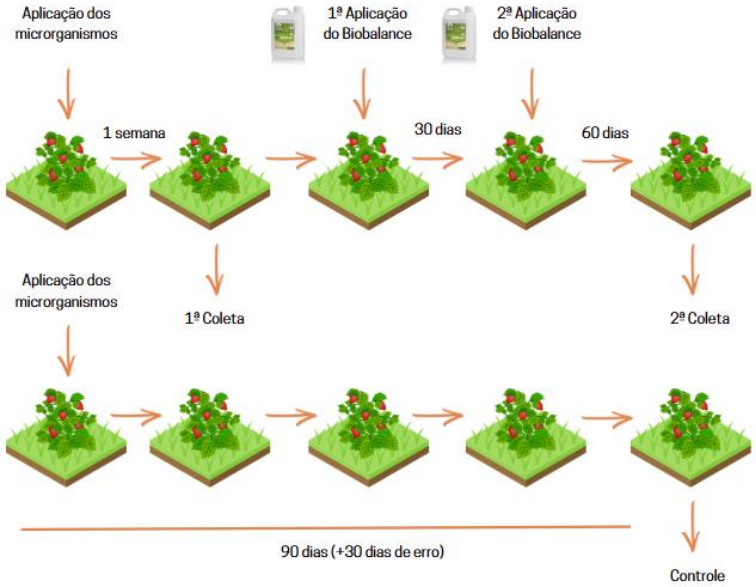


Figura 7 – Aplicação do Biobalance (A autora)

4.2 Quantificação da enzima β-glicosidase

O método de análise enzimática da Tecnologia BioAS baseia-se nos protocolos estabelecidos por Tabatabai (1994), com a modificação de não utilizar tolueno nas reações. Diversos estudos demonstraram que, em análises com tempo de incubação de 1 hora, a adição de tolueno não é essencial. Além disso, sua remoção representa uma importante vantagem do ponto de vista ambiental e ocupacional, considerando a alta toxicidade do composto e os riscos associados à saúde dos trabalhadores e ao manuseio laboratorial seguro (Mendes, 2025).

Os materiais utilizados foram:

- Peneiras 2,0 mm
- Erlenmeyers 50,0 mL com rolhas de borracha
- Copos plásticos de 50,0 mL
- Filtros Macherey-Nagel Ø 110,0 mm, No. 2
- Balança analítica com precisão de 4 casas decimais
- Espectrômetro UV-Vis Agilent 8454
- Cubeta de quartzo com caminho óptico de 10,0 mm
- Estufa
- pHmetro

As soluções utilizadas foram:

- Solução MUB pH 6,0 (*Modified Universal Buffer*): Foi preparada a partir de uma solução estoque de MUB dissolvendo-se 12,1 g de THAM, 11,6 g de ácido maleico, 14,0 g de ácido cítrico, 6,3 g de ácido bórico e 488,0 mL de NaOH e completando com água destilada em um balão volumétrico de 1 L. A partir dessa solução, foram retirados 200,0 mL, cujo pH foi ajustado para 6,0 com solução de HCl 0,1 M. Em seguida, o volume foi completado para 1 L com água destilada, obtendo-se a solução tampão final utilizada nas análises. Ambas as soluções foram armazenadas a 4 ºC.

- Solução de PNG 0,025 M (p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo): Para o preparo, dissolveu-se 0,377 g de PNG em solução tampão MUB (pH 6,0), completando-se o volume para 50 mL em balão volumétrico. Por ser uma substância fotossensível e suscetível à degradação, a solução foi acondicionada em frascos de vidro âmbar e armazenada a 4 ºC. Visualmente, a solução deve apresentar-se incolor, o aparecimento de coloração amarelada indica degradação do composto.

- Solução $CaCl_2$ 0,5 M: Foi dissolvido 73,5 g de cloreto de cálcio dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) em água destilada, ajustando-se o volume final para 1 L em balão volumétrico. A solução foi mantida a 4 ºC.

- Solução THAM (Tris-hidroximetil-amino-metano) pH 12: Dissolveu-se 12,2 g de THAM em água destilada, o pH foi ajustado para 12 com solução NaOH 0,5 M e o

volume completado com água destilada em um balão volumétrico de 1 L. A solução foi mantida a 4 ºC.

- Solução p-nitrofenol 0,05 g/L: Inicialmente, foi preparada uma solução estoque dissolvendo-se 1,0 g de p-nitrofenol em 1,0 L de água destilada. A partir dessa solução, 5,0 mL foram diluídos em um balão volumétrico de 100 mL com água destilada. Ambas as soluções foram armazenadas a 4 ºC.

A análise baseia-se na reação da enzima β-glicosidase com seu substrato específico, o p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (PNG), resultando na liberação de p-nitrofenol (PNP), conforme ilustrado nas Figuras 8 e 9. O PNP apresenta absorção característica na região do UV-Vis, com pico máximo de absorção entre 400-420 nm, permitindo sua quantificação por espectrofotometria, com base em uma curva de calibração externa previamente estabelecida.

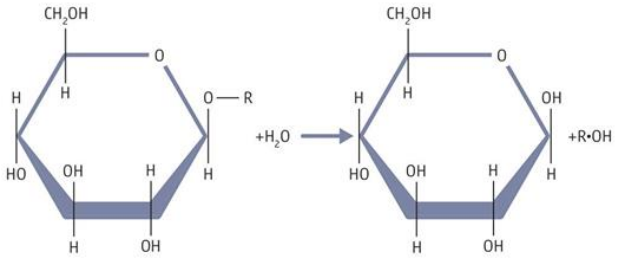


Figura 8 – Hidrólise de um substrato com a β-glicosidase atuando como catalisador (Mendes, 2025)

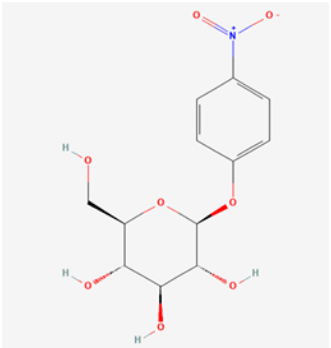


Figura 9 – Estrutura do PNG (Mendes, 2025)

A curva de calibração foi construída conforme os valores apresentados na Tabela 5, respeitando a ordem de preparo descrita, iniciando-se pela adição da água destilada, seguida de solução de p-nitrofenol (PNP), solução $CaCl_2$ e finalizando com a solução de THAM. As

soluções com volume final de 10 mL foram preparadas em copos plásticos descartáveis (50 mL) com o intuito de agilizar o preparo dos padrões a amostras.

A faixa de 25 a 250 µg de p-nitrofenol foi adequada para a maioria das amostras analisadas. No entanto, para aquelas com concentrações mais baixas, foi necessário incluir um ponto adicional na curva de calibração, correspondente a 12,5 µg.

Tabela 5 – Preparação das soluções padrão da curva de calibração da β-glicosidase

Massa PNP (µg)	Concentração PNP (µg/mL)	Água OR (mL)	Solução PNP 50,0 µg/mL (mL)	Solução $CaCl_2$ 0,5 M (mL)	Solução THAM pH 12 (mL)
0	0	5,0	0	1,0	4,0
25,0	2,5	4,5	0,5	1,0	4,0
50,0	5,0	4,0	1,0	1,0	4,0
100,0	10,0	3,0	2,0	1,0	4,0
150,0	15,0	2,0	3,0	1,0	4,0
200,0	20,0	1,0	4,0	1,0	4,0
250,0	25,0	0	5,0	1,0	4,0

Os valores de concentração de PNP, em µg/mL, estão listados na Tabela 5. Nas tabelas seguintes, porém, optou-se por apresentar os dados diretamente em massa de PNP (µg), para manter coerência com o resultado final (atividade enzimática expressa em µg de PNP por grama de solo).

Essa escolha decorre do procedimento de extração, em que o PNP é extraído de 1 grama de amostra de solo com uma mistura de soluções que totalizam um volume de 10,0 mL. Como a curva de calibração fornece concentrações em µg/mL, basta multiplicar esse valor por 10 para obter a massa total de PNP liberada em cada reação.

Além de simplificar o manuseio dos dados, essa padronização evita conversões repetidas e está em conformidade com o Procedimento Operacional Padrão (POP) da *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*, amplamente adotado pela EMBRAPA, que recomenda a apresentação dos resultados já ajustados ao volume de extração.

Para o tratamento das amostras, o solo foi previamente peneirado em malha de 2 mm. Em seguida, as amostras foram dispostas em placas de Petri e secas ao ar por uma semana. As placas foram cobertas com papel-alumínio perfurado, o que permitiu ventilação adequada para a secagem e, ao mesmo tempo, evitou perdas por dispersão.

Após o período de secagem, foram pesadas 1,00 ± 0,005 g de solo em 6 erlenmeyers de 50,0 mL, sendo cinco amostras experimentais (quintuplicata) e um controle. Antes da incubação, adicionou-se 4,0 mL da solução tampão MUB pH 6,0 a todos os frascos, e 1,0 mL da solução PNG 0,025 M apenas às amostras, excetuando-se os controles. As soluções foram homogeneizadas manualmente, os frascos foram então tampados e colocados na estufa a 37 °C por uma hora, como pode se observar na Figura 10.



Figura 10 – Incubação das amostras a 37°C por 1 hora (A autora)

Após a incubação, as reações foram interrompidas com a adição de 1,0 mL da solução de $CaCl_2$ 0,5 M, seguida da extração do produto da reação por meio da adição de 4,0 mL da solução de THAM pH 12 (p-nitrofenol é amarelo em soluções básicas) em todos os frascos. Nos controles, a solução PNG 0,025 M foi adicionada apenas neste momento, para garantir a ausência de reação enzimática durante a incubação. Novamente, as soluções foram homogeneizadas manualmente.

Em seguida, o conteúdo dos frascos foi filtrado com papel filtro, como mostra a Figura 11, e o filtrado foi transferido para cubetas de 10 mm de caminho óptico, sendo submetido à leitura em espectrofotômetro UV-Vis. Apesar do espectro de calibração, obtido com as soluções padrão, indicar pico máximo de absorção do p-nitrofenol em 401 nm, as leituras foram também realizadas a 420 nm, conforme a padronização estabelecida pela EMBRAPA na metodologia BioAS.



Figura 11 – Filtração das amostras (A autora)

4.3 Quantificação da enzima arilsulfatase

O método de quantificação da arilsulfatase segue princípios semelhantes ao da β-glicosidase, tendo sido igualmente baseado no protocolo clássico de Tabatabai (1994), conforme adaptado pela EMBRAPA na metodologia BioAS. No entanto, há diferenças importantes quanto à composição da solução tampão, ao substrato utilizado, à solução extratora e ao comprimento de onda adotado para leitura em espectrofotometria UV-Vis.

Os materiais utilizados foram os mesmos da seção 4.2. As soluções utilizadas foram:

- Solução tampão acetato pH 5,8: Dissolveu-se 68,0 g de acetato de sódio trihidratado em água destilada, ajustando-se o pH da solução para 5,8 com ácido acético glacial (99%). Em seguida, o volume foi completado para 1 L em balão volumétrico com água destilada e foi armazenada a 4 ºC.

- Solução PNS 0,05 M (p-nitrofenil sulfato): Dissolveu-se 0,614 g de PNS em tampão acetato e o volume foi completado para 50 mL em balão volumétrico. A solução teve de ser armazenada a 4 ºC e em frasco de vidro âmbar devido a fotossensibilidade.

- Solução NaOH 0,5 M: Dissolveu-se 20,0 g de NaOH em água destilada e o volume foi completado para 1 L em balão volumétrico.

- Solução $CaCl_2$ 0,5 M: Preparada conforme seção 4.2.

- Solução p-nitrofenol 0,05 g/L: Preparada conforme seção 4.2.

Assim como no método da β-glicosidase, a reação de hidrólise catalisada pela arilsulfatase resulta na liberação de p-nitrofenol (PNP), conforme representado na Equação 1. A estrutura do PNS é demonstrada na Figura 12.

$$R.O.SO_3^- + H_2O \rightarrow R.OH + H^+ + SO_4^{2-} \qquad \text{Equação 2}$$

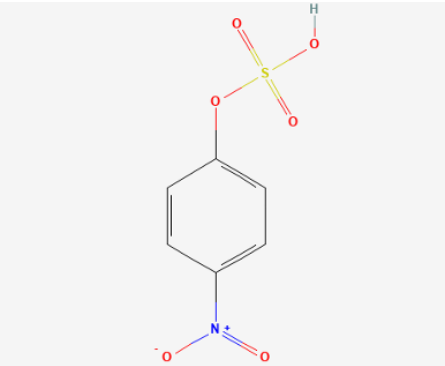


Figura 12 – Estrutura do PNS (Mendes, 2025)

As soluções padrão utilizadas para a construção da curva de calibração externa nas análises de arilsulfatase foram preparadas conforme a ordem apresentada na Tabela 6. Observou-se que a adição de NaOH, em presença de $CaCl_2$, ocasiona a formação de precipitados. Para evitar interferências na leitura espectrofotométrica, todas as soluções padrão foram filtradas, como mostra a Figura 13.

Tabela 6 – Preparação das soluções padrão da curva de calibração da arilsulfatase

Massa PNP (µg)	Água OR (mL)	Solução PNP 50,0 µg/mL (mL)	Solução $CaCl_2$ 0,5 M (mL)	Solução NaOH 0,5 M (mL)
0	5,0	0	1,0	4,0
25,0	4,5	0,5	1,0	4,0
50,0	4,0	1,0	1,0	4,0
100,0	3,0	2,0	1,0	4,0
150,0	2,0	3,0	1,0	4,0
200,0	1,0	4,0	1,0	4,0
250,0	0	5,0	1,0	4,0



Figura 13 – Filtração da curva de calibração da arilsulfatase (A autora)

O tratamento das amostras seguiu os mesmos procedimentos descritos na seção 4.2, exceto pelas soluções empregadas. Utilizou-se a solução tampão acetato pH 5,8 no lugar da

MUB pH 6,0, e o substrato aplicado foi o PNS 0,05 M, substituindo o PNG 0,025 M. Além disso, a extração foi realizada com solução de NaOH 0,5 M, em vez da solução THAM pH 12.

O espectro do p-nitrofenol também apresentou máxima absorbância em 401 nm sob essas condições. No entanto, a EMBRAPA padronizou as leituras espectrofotométricas em 410 nm para a análise de arilsulfatase. Por esse motivo, as amostras foram analisadas em ambos os comprimentos de onda.

4.4 Análise dos resultados

Os dados foram analisados no programa Excel. As concentrações das amostras foram obtidas pela regressão linear dos gráficos construídos com os valores de concentração das soluções padrão e suas respectivas absorbâncias. Como exemplo, a Figura 14 apresenta a curva de calibração construída para as amostras da região de Piedade na análise da atividade da enzima β-glicosidase.

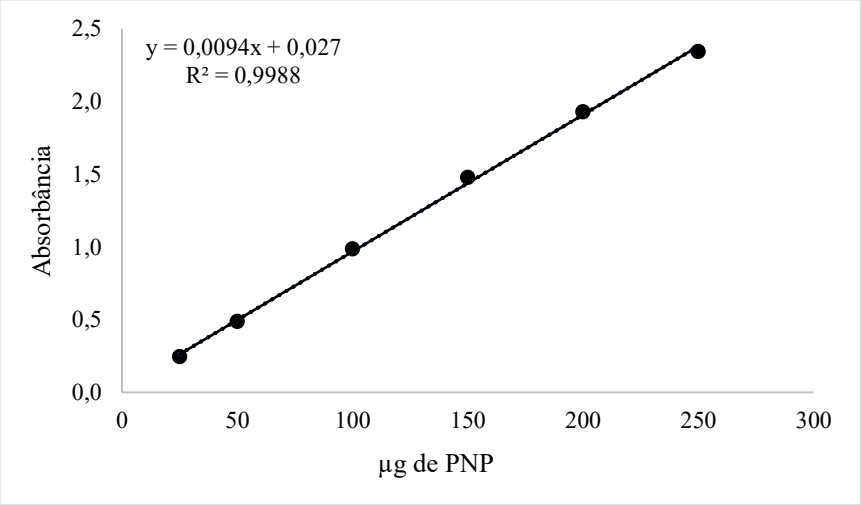


Figura 14 – Curva de calibração β-glicosidase em 420 nm (Absorbância x Massa PNP em µg) (A autora)

Considerando a equação da reta na forma $y = ax + b$, a concentração de p-nitrofenol (valor de x) pode ser determinada a partir da absorbância da amostra (y), obtida experimentalmente, conforme mostra a Equação 2. A concentração final das amostras é medida pela média ($\bar{x}$) das replicadas e expressa em µg de p-nitrofenol/g de solo.h a 37°C.

$$x = \frac{y-b}{a}$$ Equação 2

É importante ressaltar que os protocolos já publicados descontam o controle manualmente das amostras (Mendes, 2025). Entretanto, o tipo de espectrofotômetro utilizado nesse trabalho não permitiu essa abordagem e os controles foram descontados automaticamente durante a leitura das amostras.

O protocolo publicado pela FAO estabelece que a precisão deve ser avaliada pela Diferença Relativa Percentual (RPD), aplicável a experimentos realizados em duplicata. Entretanto, o experimento foi feito em quintuplicata e a precisão foi medida com Desvio Padrão Amostral (DP) e Coeficiente de Variação (CV %), calculados com as Equações 3 e 4. A diferença percentual entre as replicatas deve ser menor que 15 % (Mendes, 2025).

$$DP = \sqrt{\frac{1}{n-1}\sum_{i=n}^{n}(xi - \bar{x})^2} \qquad \text{Equação 3}$$

$$CV\% = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\% \qquad \text{Equação 4}$$

As amostras foram classificadas em alta, média ou baixa atividade enzimática (Tabela 7) com base nos valores de referência estabelecidos pela EMBRAPA.

Tabela 7 – Valores de referência para Latossolos Vermelhos argilosos de cerrado, sob cultivos anuais, na camada de 0 cm a 10 cm, utilizando o conceito Fertbio: específica para amostras de solo coletadas na fase de pós-colheita e secas ao ar (Adaptado de Mendes *et al.*, 2018)

Bioindicador[1]	Classe de interpretação		
-	**Baixo**	**Moderado**	**Alto/Adequado**
β-glicosidase	**≤ 66**	**67-115**	**> 116**
Arilsulfatase	**≤ 30**	**31-70**	**> 71**

[1] Valores de C da biomassa microbiana expressos em mg de C/kg de solo; valores de atividade de β-glicosidase, fosfatase ácida e arilsulfatase expressos em mg de p-nitrofenol/kg de solo.h (ou µg de p-nitrofenol/g solo.h).

As faixas de referência para classificar a atividade enzimática são resultados de extensos estudos de solos e cultivos do Cerrado, de modo que as amostras coletadas em regiões fora desse bioma não se encaixam necessariamente nesses padrões. Entretanto, no momento, são as únicas referências disponíveis na literatura (Mendes, 2025).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos para a atividade das enzimas β-glicosidase e arilsulfatase nas três regiões analisadas, considerando os três comprimentos de onda avaliados, bem como os

respectivos desvios padrão e coeficientes de variação (CV%), estão apresentados nas Tabelas 8 e 9. A codificação por cores segue os valores de referência estabelecidos pela EMBRAPA (Tabela 7), sendo: vermelho para atividade enzimática baixa, amarelo para moderada e verde para adequada.

Tabela 8 – Atividade enzimática em 401 nm (A autora)

β-glicosidase 401 nm				Arilsulfatase 401 nm			
Piedade – SP							
Amostras	µg de PNP/g de solo.h a 37°C	DP	CV %	Amostras	µg de PNP/g de solo.h a 37°C	DP	CV %
Controle	64,70	6,56	10,14	Controle	166,55	7,43	4,46
1	40,06	7,61	18,99*	1	109,30	12,74	11,65
2	63,46	7,41	11,67	2	132,29	10,78	8,15
Pouso Alegre – MG							
Amostras	µg de PNP/g de solo.h a 37°C	DP	CV %	Amostras	µg de PNP/g de solo.h a 37°C	DP	CV %
Controle	50,48	4,38	8,69	Controle	61,36	3,96	6,46
1	28,45	1,40	4,91	1	109,04	3,66	3,36
2	48,71	2,29	4,70	2	105,48	7,74	7,34
Senador Amaral – MG							
Amostras	µg de PNP/g de solo.h a 37°C	DP	CV %	Amostras	µg de PNP/g de solo.h a 37°C	DP	CV %
Controle	22,07	1,70	7,72	Controle	50,77	0,34	0,66
1	13,97	0,99	7,08	1	16,80	2,21	13,17
2	12,77	2,94	23,02*	2	8,17**	4,21	51,53*

Legenda: 1 = amostras antes da aplicação do produto, 2 = amostras após 90 dias, Controle = amostra após 90 dias sem o produto aplicado, DP = Desvio Padrão, CV = Coeficiente de Variação, *Valores altos de CV, **Valores entre LD e LQ.

Tabela 9 – Atividade enzimática em 420 nm (β-glicosidase) e 410 nm (arilsulfatase) (A autora)

β-glicosidase 420 nm				Arilsulfatase 410 nm			
Piedade – SP							
Amostras	µg de PNP/g de solo.h a 37°C	DP	CV %	Amostras	µg de PNP/g de solo.h a 37°C	DP	CV %
Controle	61,23	6,94	11,34	Controle	166,06	6,62	3,99
1	41,02	7,41	18,07	1	113,65	11,78	10,37
2	64,12	6,70	10,45	2	134,01	9,57	7,14
Pouso Alegre – MG							
Amostras	µg de PNP/g de solo.h a 37°C	DP	CV %	Amostras	µg de PNP/g de solo.h a 37°C	DP	CV %
Controle	51,93	4,83	9,30	Controle	60,44	4,14	6,85
1	30,55	1,46	4,77	1	112,97	3,99	3,53
2	50,48	2,27	4,49	2	108,92	8,42	7,73
Senador Amaral – MG							
Amostras	µg de PNP/g de solo.h a 37°C	DP	CV %	Amostras	µg de PNP/g de solo.h a 37°C	DP	CV %
Controle	25,17	1,74	6,92	Controle	50,49	0,29	0,58
1	17,04	1,11	6,53	1	17,51	2,05	11,71
2	16,52	3,25	19,66*	2	8,90**	3,85	43,29*

Legenda: 1 = amostras antes da aplicação do produto, 2 = amostras após 90 dias, Controle = amostra após 90 dias sem o produto aplicado, DP = Desvio Padrão, CV = Coeficiente de Variação, *Valores altos de CV, **Valores entre LD e LQ.

Alguns resultados apresentaram valores de CV% elevados, indicando alta variabilidade entre as replicatas, mesmo tendo sido feita análises em quintuplicata. Em laboratório, retirou-se uma fração de cada amostra e fez-se uma homogeneização ao peneirar (<2 mm) e secar. É provável que esta homogeneização laboratorial não tenha sido suficiente para algumas amostras, como as de Senador Amaral (MG) gerando resultados menos precisos. Esses altos valores de CV podem estar associados a uma alta complexidade da matriz solo e/ou aos baixos valores de enzimas encontrados em algumas dessas amostras, principalmente a da arilsulfatase de Senador Amaral (MG), cujo resultado ficou entre o LD e LQ (valores calculados e discutidos pelas alunas Bianca Perinazzo e Catarina Medeiros em seus TCCs).

Os espectros de absorção do PNP obtidos pelos métodos da β-glicosidase e arilsulfatase estão apresentados nas Figuras 15 e 16, considerando os ensaios da região de Piedade (SP). Observa-se que os comprimentos de onda padronizados pela EMBRAPA não coincidem com o pico máximo de absorção, o que pode estar relacionado ao aumento do ruído nas concentrações mais altas.

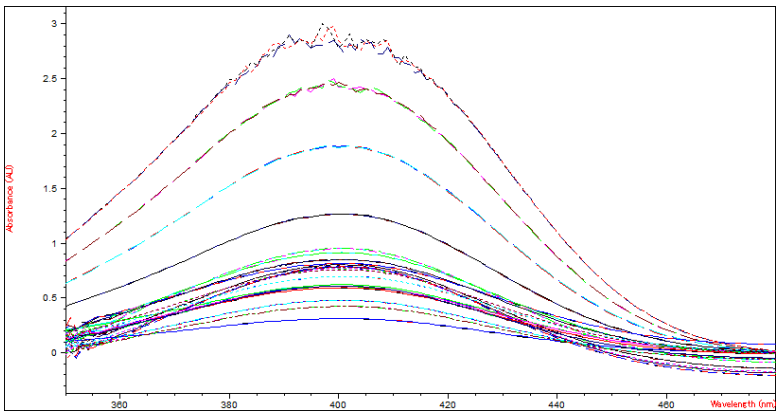


Figura 15 – Espectro de absorção do PNP (β-glicosidase) (A autora)

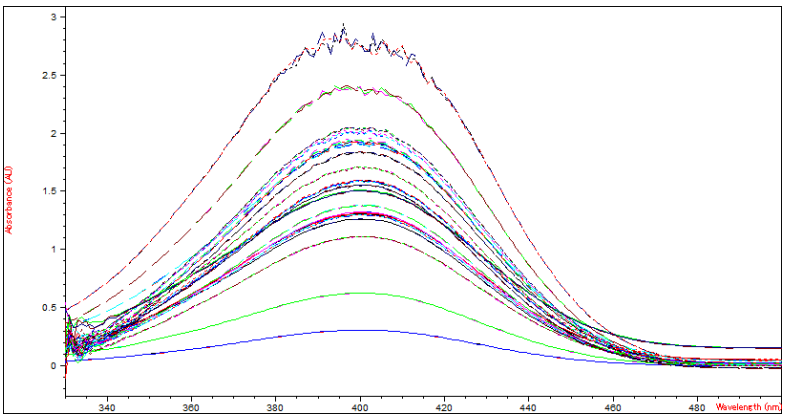


Figura 16 – Espectro de absorção do PNP (arilsulfatase) (A autora)

Em concentrações elevadas, a ocorrência de interferências ópticas decorrentes da interação entre moléculas na solução pode comprometer a linearidade da leitura espectrofotométrica, violando os pressupostos da Lei de Beer-Lambert. Ainda assim, a adoção dessa faixa elevada de concentração pode ter sido orientada por critérios práticos, considerando-se a necessidade de processar rotineiramente um grande número de amostras com alta atividade enzimática. A diluição individual de cada amostra demandaria mais tempo, recursos e etapas adicionais. Nesse contexto, a padronização de um comprimento de onda e de uma faixa de concentração favorece a reprodutibilidade entre laboratórios e a eficiência operacional do método, ainda que com pequena perda de sensibilidade analítica.

Um dos principais pontos críticos do experimento foi a coleta tardia dos controles, que comprometeu a capacidade de atribuir com segurança as alterações na atividade enzimática ao efeito do prebiótico. Sem controles devidamente coletados e comparáveis no tempo, torna-se difícil excluir a influência de fatores externos, como variações climáticas, manejo do solo ou dinâmica microbiana natural.

Os resultados de β-glicosidase para as amostras de Piedade (SP) e Pouso Alegre (MG) parecem indicar que o prebiótico utilizado surtiu efeitos no aumento desta enzima quando se compara as amostras 1 (antes da aplicação) e 2 (após a aplicação). Os resultados dos controles desses dois locais apresentaram teores de β-glicosidase tão altos quanto as amostras 2. Se estes controles tivessem sido coletados no mesmo momento das amostras 2 isto seria um indicativo de que o prebiótico não teve ação na enzima. No entanto, por falha técnica, as amostras controles só foram coletadas 1-2 meses após a coleta das amostras 2. Então outros fatores podem ter contribuído para o aumento desta enzima nos controles. Deste modo ficou difícil concluir se o prebiótico teve ou não influência no aumento dos valores de β-glicosidase.

Já os resultados de β-glicosidase em Senador Amaral (MG), comparando-se as amostras 1 e 2, é possível afirmar que o prebiótico não teve influência no aumento da atividade desta enzima. E o mais alto valor na amostra controle (também coletada entre 1-2 após a amostra 2) pode ser devido a outros fatores desconhecidos.

A proposta inicial era aplicar testes estatísticos para comparar os valores de enzimas antes e após a aplicação do produto. Porém, com a falha da coleta dos controles, e os valores sistematicamente mais altos que as amostras 2, decidiu-se não dedicar mais esforços nesta avaliação.

Os resultados de arilsulfatase foram ainda mais complexos. As amostras controle para Piedade (SP) e Senador Amaral (MG) apresentaram valores mais altos até mesmo que as amostras 2. Mas o controle de Pouso Alegre (MG) mostrou um resultado de arilsulfatase bem menos que as amostras 1 e 2. Várias dúvidas surgiram com relação a este resultado: A amostra enviada é de fato o controle desta área? e/ou O solo desta área sofreu novas intervenções que diminuíram a concentração de arilsulfatase?

Esperava-se que o Biobalance aumentasse a atividade enzimática do solo, pois prebióticos à base de microalgas estimulam o crescimento de microrganismos benéficos, como PGPRs e fungos micorrízicos e favorecem antagonistas naturais de patógenos, resultando em maior diversidade metabólica e intensificação das reações enzimáticas (Alahmad *et al.*, 2024).

No entanto, os resultados apresentaram grande variabilidade, dificultando a identificação de correlações consistentes entre as amostras. Algumas hipóteses podem explicar essa ausência de padrão: (i) o prebiótico aplicado pode não ter exercido efeito significativo sobre a atividade enzimática do solo; (ii) o período de observação de 90 dias pode ter sido insuficiente para que alterações mensuráveis ocorressem; ou ainda (iii) a concentração utilizada pode não ter sido adequada para promover mudanças detectáveis nas enzimas avaliadas.

Outro aspecto fundamental a ser considerado é a escolha adequada do método de armazenamento e secagem do solo, conforme os objetivos do estudo, segundo documento recente publicado por Mendes (2025) e desconhecido no momento do planejamento experimental deste projeto. Segundo este protocolo, para refletir com maior fidelidade as condições reais do solo no momento da coleta (condições *in situ*) e com o intuito de avaliar a influência de novos manejos nas atividades enzimáticas, recomenda-se que as amostras sejam armazenadas a 4 °C e analisadas o mais rapidamente possível, com solo ainda úmido.

Neste projeto a coleta e preservação da amostra realizadas se baseou nos protocolos convencionais da Tecnologia BioAS em que as amostras são armazenadas à temperatura ambiente e submetidas à secagem ao ar (Mendes, 2025) com o objetivo de acessar a saúde e a "memória" do solo. A secagem ao ar provoca uma rápida inativação da microbiota ativa, reduzindo sobretudo a atividade de enzimas intracelulares associadas à biomassa microbiana viável. Por outro lado, exerce impacto muito menor sobre as enzimas extracelulares, que permanecem protegidas e estabilizadas na matriz do solo. Segundo Mendes (2025), diferentes estudos relatam respostas divergentes: em determinados casos, a atividade de certas enzimas pode diminuir,

manter-se inalterada ou até aumentar após a secagem, refletindo a complexa interação entre tipo de solo, teor de matéria orgânica e histórico de manejo.

Como a amostragem e a preservação das amostras foram conduzidas com base no protocolo da EMBRAPA, os resultados obtidos provavelmente refletem a "memória do solo", ou seja, os efeitos cumulativos de manejos anteriores a que as áreas estudadas haviam sido submetidas (aplicação de microrganismos e/ou cultivo de diferentes safras), influenciando mais diretamente a atividade enzimática registrada do que o manejo realizado para este trabalho.

Para investigações futuras, recomenda-se a elaboração e padronização de Procedimentos Operacionais Padrão (POPs) voltados aos parceiros de campo, com o objetivo de assegurar o cumprimento rigoroso tanto do cronograma quanto das técnicas de amostragem. Esses procedimentos devem contemplar, simultaneamente, os dois objetivos principais: acessar a “memória do solo” (secando as amostras ao ar e preservando à temperatura ambiente) e avaliar a atividade enzimática no momento da coleta (preservando as amostras a 4ºC, sem secar).

6 CONCLUSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar se a aplicação do prebiótico comercial Biobalance, à base de extrato de microalgas, altera a atividade das enzimas β-glicosidase e arilsulfatase em solos cultivados com morangueiro. Para isso, foram feitos ensaios de campo em três regiões, coletando amostras antes e 90 dias após a aplicação (além de um controle sem prebiótico) e quantificando a atividade enzimática pelo protocolo BioAS da EMBRAPA.

Diante dos resultados, ainda que não tenha sido possível estabelecer uma relação consistente entre a aplicação do prebiótico e a atividade enzimática do solo, o trabalho proporcionou importantes aprendizados sobre as etapas críticas da análise enzimática e do delineamento experimental em campo. A tentativa de reproduzir fielmente o protocolo BioAS da EMBRAPA evidenciou que esse método, voltado à avaliação da “memória do solo”, pode não ser o ideal para detectar efeitos recentes de manejos.

Além disso, a falha na coleta do controle reforça o papel determinante do desenho experimental: sem um controle devidamente coletado, não foi possível atribuir com segurança qualquer mudança na atividade enzimática ao tratamento aplicado. Assim, a definição clara de

datas de aplicação, de coleta e de critérios de amostragem torna-se tão relevante quanto a metodologia analítica propriamente dita.

Para investigações futuras, recomenda-se a elaboração e padronização de Procedimentos Operacionais Padrão (POPs) direcionados aos parceiros de campo, de modo a garantir o cumprimento rigoroso do cronograma e das técnicas de amostragem, considerando ambos objetivos, acessar a "memória do solo" e avaliar a atividade enzimática "momentânea", detalhando a importância dos controles e de sua coleta em paralelo, e definindo um número mínimo de réplicas e critérios de homogeneização que assegurem a extração de informações confiáveis e a robustez estatística dos resultados.

Em suma, embora não tenha confirmado o efeito do prebiótico sobre β-glicosidase e arilsulfatase, o estudo ressaltou que a confiabilidade dos resultados depende tanto da robustez analítica quanto do planejamento dos experimentos de campo, lições fundamentais para otimizar os próximos passos nos estudos envolvendo a relação entre aplicação de insumos agrícolas e atividade enzimática.

BIBLIOGRAFIA

AGRIFORLIFE. Agriforlife: Ciência e tecnologia conectadas ao campo. Disponível em: https://www.agriforlife.com.br/. Acesso em: 3 jul. 2025.

ALAHMAD, A.; EDELMAN, L.; BERNARDON-MERY, A.; CASTEL, L.; LAVAL, K.; THIOYE, B.; TRINSOUTROT-GATTIN, I. Prebiotics: a solution for improving plant growth, soil health, and carbon sequestration? **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 23, p. 6647–6669, 2023. DOI: https://doi.org/10.1007/S42729-023-01517-8.

ALAHMAD, A.; EDELMAN, L.; BERNARDON-MERY, A.; BOUTEILLER, M.; CASTEL, L.; LAVAL, K.; RIAH-ANGLET, W.; THIOYE, B.; TRINSOUTROT-GATTIN, I. Unveiling the impact of soil prebiotics on rhizospheric microbial functionality in Zea mays L. **Agriculture (Switzerland)**, v. 14, n. 7, p. 1115, 2024. DOI: https://doi.org/10.3390/agriculture14071115/s1.

BIORIZON BIOTECH. Biobalance: prebiotic with biostimulant action on soil microorganisms. Available from: https://www.biorizon.es/productos_biorizon/bioestimulantes-y-biopotenciadores/biobalance/. Acesso em: 4 Jul. 2025.

BRAUN, J. C. A.; COLLA, L. M. Use of microalgae for the development of biofertilizers and biostimulants. **BioEnergy Research**, v. 16, n. 1, p. 289–310, 2022. DOI: https://doi.org/10.1007/S12155-022-10456-8.

BRUGMAN, S.; IKEDA-OHTSUBO, W.; BRABER, S.; FOLKERTS, G.; PIETERSE, C. M. J.; BAKKER, P. A. H. M. A comparative review on microbiota manipulation: lessons from fish, plants, livestock, and human research. **Frontiers in Nutrition**, v. 5, art. 80, 2018. DOI: https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00080.

COSTA, K. K. S.; CAMPOS, D. T. da S. Atividade enzimática de microrganismos em diferentes teores de umidade do solo. In: SILVA-MATOS, R. R. S.; SOUSA, L. A. M.; EVANGELISTA, R. C. O. (orgs.). **Ciências agrárias: conhecimento e difusão de tecnologias.** Ponta Grossa: Atena Editora, 2022. p. 194–201. DOI: https://doi.org/10.22533/at.ed.629221002.

CHABILI, A.; MINAOUI, F.; HAKKOUM, Z.; DOUMA, M.; MEDDICH, A.; LOUDIKI, M. A comprehensive review of microalgae and cyanobacteria-based biostimulants for agriculture uses. **Plants**, v. 13, n. 2, p. 159, 2024. DOI: https://doi.org/10.3390/PLANTS13020159.

DENG, S.; POPOVA, I. Carbohydrate hydrolases. In: DICK, R. P. (ed.). **Methods of soil enzymology**. Madison: Soil Science Society of America, 2011. p. 185–209. (SSSA Book Series, n. 9). DOI: https://doi.org/10.2136/sssabookser9.c9.

DU JARDIN, P. Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 3–14, 2015. ISSN 0304-4238. DOI: https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021.

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

FONSECA, E. V. Atividade enzimática como indicadora de qualidade do solo. 2021. 30 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2021.

INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY. EC 3.2.1 – Glycosidases, i.e. enzymes that hydrolyse O- and S-glycosyl compounds. IUBMB Enzyme Nomenclature. Disponível em: https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/EC3/2/1/. Acesso em: 28 maio 2025.

INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY (IUBMB). EC 3.1.6: Sulfuric ester hydrolases. Disponível em: https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/EC3/1/6/. Acesso em: 28 maio 2025.

KAPOORE, R. V.; WOOD, E. E.; LLEWELLYN, C. A. Algae biostimulants: a critical look at microalgal biostimulants for sustainable agricultural practices. **Biotechnology Advances**, v. 49, p. 107754, 2021. DOI: https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2021.107754.

KARACA, A.; CETIN, S. C.; KIZILKAYA, R.; TURGAY, O. C. Soil enzymes as indication of soil quality. In: SHUKLA, G.; VARMA, A. (eds.). **Soil enzymology**. Berlin; Heidelberg: Springer, 2010. p. 119–148. (Soil Biology, v. 22). DOI: 10.1007/978-3-642-14225-3_7.

KLOSE, S.; BILEN, S.; TABATABAI, M. A.; DICK, W. A. Sulfur cycle enzymes. In: DICK, R. P. (ed.). **Methods of soil enzymology**. Madison: Soil Science Society of America, 2011. cap. 7. DOI: https://doi.org/10.2136/sssabookser9.c7.

MALAQUIAS, J. V. [In memoriam]; MENDES, I. C.; CHAER, G. M.; REIS JUNIOR, F. B.; SOUSA, D. M. G.; DANTAS, O. D.; OLIVEIRA, M. I. L. Tecnologia BioAS: uma maneira simples e eficiente de avaliar a saúde do solo. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2021.

MENDES, I. C.; CHAER, G. M.; SOUSA, D. M. G.; JUNIOR, F. B. R.; DANTAS, O. D.; OLIVEIRA, M. I. L.; LOPES, A. A. C.; SOUZA, L. M. Bioanálise de Solo: a mais nova aliada para a sustentabilidade agrícola. **Nutrição de Plantas: Ciência e Tecnologia (NPCT)**, n. p., p. 1–11, dez. 2020. Disponível em: https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1128778/1/IEDA%20Bioanalise-do-solo-informacoes-agronomicas.pdf.

MENDES, I. C.; SOUSA, D. M. G.; JÚNIOR, F. B. R.; LOPES, A. A. C. Bioanálise de solo: como acessar e interpretar a saúde do solo. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2018. Circular Técnica, n. 38.

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

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA (Brasil). Conceitos – Programa Nacional de Bioinsumos. Portal Gov.br, Brasília, 27 maio 2020. Atualizado em 14 maio 2025.

Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inovacao/bioinsumos/o-programa/conceitos. Acesso em: 2 jul. 2025.

MIRANDA, A. M.; HERNANDEZ-TENORIO, F.; VARGAS, G. J.; VILLALTA, F.; SÁEZ, A. A. Advances in the development of biofertilizers and biostimulants from microalgae. **Biology**, v. 13, n. 3, p. 199, 2024. DOI: https://doi.org/10.3390/BIOLOGY13030199.

MOLINA JUNIOR, W. F. Comportamento mecânico do solo em operações agrícolas. Piracicaba: ESALQ/USP, 2017. DOI: 10.11606/9788592238407.

NAIK, K.; MISHRA, S.; SRICHANDAN, H.; SINGH, P. K.; SARANGI, P. K. Plant growth promoting microbes: potential link to sustainable agriculture and environment. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 21, p. 101326, 2019. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101326.

RONGA, D.; BIAZZI, E.; PARATI, K.; CARMINATI, D.; CARMINATI, E.; TAVA, A. Microalgal biostimulants and biofertilisers in crop productions. **Agronomy**, v. 9, n. 4, p. 192, 2019. DOI: https://doi.org/10.3390/agronomy9040192.

SANTOS, A. C. M.; SANTOS, A. C.; ANJOS, S. S. N.; ROSADO, T. B.; CANÇADO, L. J. Biofertilizantes de microalgas: desafios para uma produção competitiva e sustentável. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA E INOVAÇÃO DE BIODIESEL, 7., 2019, Florianópolis. Anais… Florianópolis: Rede Brasileira de Tecnologia e Inovação de Biodiesel, 2019.

SANTOS, N. H. S. dos; SILVEIRA, A. C. D.; FERNANDES, V. de O.; MACHADO, L. P. Efeito do extrato de algas no desempenho germinativo e crescimento radicular em sementes de feijão BRS Estilo em resposta a diferentes métodos de aplicação. **Hoehnea**, v. 48, 2021. DOI: https://doi.org/10.1590/2236-8906-100/2020.

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**, v. 110, 151050, 2025. ISSN 0031-4056. DOI: https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2025.151050.

SILVA, C. A.; CERRI, C. E. P.; ANDRADE, C. A. de; MARTIN NETO, L.; BETTIOL, W. Matéria orgânica do solo: ciclo, compartimentos e funções. In: BETTIOL, W.; SILVA, C. A.; CERRI, C. E. P.; MARTIN NETO, L.; ANDRADE, C. A. de (eds.). Entendendo a matéria orgânica do solo em ambientes tropical e subtropical. Brasília, DF: Embrapa, 2023. cap. 1, p. 17–47.

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, e0210109, 2021. DOI: https://doi.org/10.36783/18069657rbcs20210109.

TABATABAI, M. A.; BREMNER, J. M. Arylsulfatase activity of soils. **Soil Science Society of America Journal**, v. 34, p. 225–229, 1970. DOI: https://doi.org/10.2136/sssaj1970.03615995003400020016x.

TABATABAI, M. A.; DICK, W. A. Enzymes in soil: research and developments in measuring activities. In: BURNS, R. G.; DICK, R. P. (eds.). Enzymes in the environment: activity, ecology, and applications. New York: Marcel Dekker, 2002. p. 567–596. ISBN 0-8247-0614-5.

TABATABAI, M. A. Soil enzymes. In: WEAVER, R. W. et al. (eds.). Methods of soil analysis. Madison: Soil Science Society of America, 1994. cap. 37. DOI: https://doi.org/10.2136/sssabookser5.2.c37.

TRIGUEIRO, R. M. Ciência do solo: física e conservação do solo e água. Londrina: Editora e Distribuidora Educacional S.A., 2019. 192 p.