

## Artigo

## Desenvolvimento de Metodologia Analítica para Determinação da Atividade da Urease no Solo

Rezende, C. I. P.; de Oliveira, F. M.; de Melo, E. I.\*

Rev. Virtual Quim., 2018, 10 (5), 1304-1315. Data de publicação na Web: 5 de novembro de 2018

<http://rvq.sbq.org.br>

### Development of Analytical Methodology for the Determination of Soil Urease Activity

**Abstract:** Urease is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of urea into carbon dioxide and ammonia, and its soil activity can be evaluated by monitoring the concentration of the products or reagents in the reaction. This work presents the development of a novel analytical methodology to evaluate the enzymatic activity of the urease in the soil, from the quantification of ammonium ion, product of urea hydrolysis, using flow injection analysis with gas diffusion and conductometric detection. The results were compared with the colorimetric method. The conductivity response was evaluated for flow parameters and NaOH concentration. The method presented a linear range of 0.02 to 4.0 mmol L<sup>-1</sup> of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, limit of detection 0.02 mmol L<sup>-1</sup> and theoretical analytical frequency of 28 h<sup>-1</sup> samples. The proposed method presented repeatability and accuracy comparable to the colorimetric method. The practicality, the high analytical frequency are great attractions for the use of the method proposed in the evaluation of the enzymatic activity of the urease in the soil.

**Keywords:** FIA system; enzyme; colorimetric analysis.

### Resumo

Urease é uma enzima que catalisa a hidrólise da ureia em dióxido de carbono e amônia, sendo que sua atividade no solo pode ser avaliada monitorando a concentração dos produtos ou reagentes dessa reação. O presente trabalho objetivou o desenvolvimento de metodologia analítica para avaliação da atividade enzimática da uréase no solo, a partir da quantificação do íon amônio, produto da hidrólise da ureia, utilizando análise por injeção em fluxo com difusão gasosa e detecção condutométrica. Os resultados foram comparados com o método colorimétrico. A resposta de condutividade foi avaliada para os parâmetros de fluxo e concentração de NaOH. O método apresentou faixa linear de 0,02 a 4,0 mmol L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, limite de quantificação de 0,07 mmol L<sup>-1</sup> e frequência analítica teórica de 28 amostras h<sup>-1</sup>. O método proposto apresentou precisão e exatidão comparável ao método colorimétrico. A praticidade, a elevada frequência analítica são grandes atrativos para a utilização do método proposto na avaliação da atividade enzimática da uréase no solo.

**Palavras-chave:** Sistema FIA; enzima; análise colorimétrica.

\* Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Química, Campus Monte Carmelo, CEP 38500-000, Monte Carmelo-MG, Brasil.

✉ [emelo@ufu.br](mailto:emelo@ufu.br)

DOI: [10.21577/1984-6835.20180089](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20180089)

## Desenvolvimento de Metodologia Analítica Para Determinação da Atividade da Urease no Solo

Camila I. P. Rezende,<sup>a</sup> Fabiano M. de Oliveira,<sup>b</sup> Edmar I. de Melo<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Ciências Agrárias, Campus Monte Carmelo, CEP 38500-000, Monte Carmelo-MG, Brasil.

<sup>b</sup> Universidade Federal de Goiás, Unidade Acadêmica Especial de Física e Química, CEP 75704-020, Catalão-GO, Brasil.

<sup>c</sup> Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Química, Campus Monte Carmelo, CEP 38500-000, Monte Carmelo-MG, Brasil.

\* [emelo@ufu.br](mailto:emelo@ufu.br)

*Recebido em 15 de março de 2018. Aceito para publicação em 12 de outubro de 2018*

1. Introdução
2. Material e Métodos
  - 2.1. Amostragem de solo
  - 2.2. Avaliação da atividade da urease
  - 2.3. Análise por injeção em fluxo FIA-CE
  - 2.4. Análise colorimétrica
3. Resultados e Discussão
4. Conclusão

### 1. Introdução

A produção de alimentos, fibras e energia são fundamentais para a sociedade, no entanto os processos produtivos devem corroborar com a manutenção da qualidade do solo, com foco na continuidade dos processos produtivos e preservação de recursos naturais. A possibilidade de pagamentos por serviços ambientais e de certificação de áreas agrícolas e produtos estão alinhados com a adoção de práticas que garantam a conservação do solo, e que tem demandado avaliações de sua qualidade

utilizando atributos biológicos, associados aos atributos físico-químicos, nas análises de rotina e no estabelecimento de índices de qualidade. Vários estudos mostram que parâmetros biológicos podem ser utilizados como indicadores de qualidade do solo, sendo mais sensíveis que parâmetros físico-químicos, na detecção antecipada de alterações que possam ocorrer em virtude do uso e manejo do solo.<sup>1-4</sup>

Dentre os parâmetros utilizados como indicadores da qualidade de solo, a avaliação da atividade enzimática integra informações importantes sobre as condições

microbiológicas e físico-químicas do solo<sup>5</sup>, sendo mais um parâmetro que pode avaliar o papel dos microrganismos no solo.<sup>6</sup> Vários trabalhos têm enfatizado a importância da atividade enzimática como indicador capaz de detectar diferenças entre solos e mudanças que variam em função da influência das ações antrópicas.<sup>7-9</sup>

Dentre as diversas enzimas presentes no solo, a urease (ureia amido-hidrolase) participa do ciclo do nitrogênio no solo, contribuindo para liberação de nitrogênio inorgânico, pois catalisa hidrólise de ureia a CO<sub>2</sub> e NH<sub>3</sub>, os quais são assimilados por microrganismos e plantas.<sup>10</sup> A atividade desta enzima, tem sido relatada na literatura como sendo mais sensível a presença de contaminantes do que outras enzimas presentes no solo.<sup>11-13</sup> Esta maior sensibilidade, e sua relação com a microbiota do solo, tornam a avaliação da atividade da urease um parâmetro importante na bioindicação da qualidade do solo.

As metodologias utilizadas na determinação da atividade enzimática da urease no solo, apresentam uma etapa comum, em que uma solução tamponada, contendo o substrato ureia, é colocada em contato com solo, e em seguida a mistura é incubada sob condições padronizadas por determinado período. A variação da concentração do substrato ou do produto da catálise enzimática no tempo é utilizado para avaliação da atividade enzimática, e a técnica analítica utilizada para avaliação da concentração seja do substrato ou dos produtos da reação, tem sido a etapa que diferencia uma metodologia da outra, utilizada na determinação da atividade da urease no solo. Muitos trabalhos reportam a avaliação do teor de nitrogênio amoniacal gerado pela catálise enzimática, frente ao substrato, onde o mesmo é separado do meio reacional por destilação com arraste de vapor e posteriormente quantificado por titulação.<sup>14</sup> Este método apresenta baixa frequência de análise, baixa sensibilidade e consumo considerável de reagentes. A avaliação da atividade enzimática, também tem sido realizada por métodos espectrofotométricos

<sup>8,15,16</sup> onde o produto da catálise enzimática reage especificamente com reagente colorimétrico, formando um produto cuja concentração é determinada espectrofotometricamente. Os métodos espectrométricos, apesar de apresentarem maior sensibilidade, apresentam desvantagens, pois utilizam reagentes tóxicos, custo elevado e baixa frequência de análise, limitada pelo tempo de formação do produto da reação colorimétrica.<sup>17</sup>

Os sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês *Flow Injection Analysis*), apresentam vantagens, dentre elas, possibilidade de automatização, economia no consumo de reagentes, e elevada frequência de análise.<sup>18,19</sup> Em específico, a avaliação da atividade da urease no solo, utilizando a análise por injeção em fluxo não tem sido relatado na literatura. Entretanto, vários trabalhos reportam a quantificação do íon amônio ou de ureia em várias matrizes de amostras utilizando FIA.<sup>20-22</sup> A determinação, do íon amônio, ou da ureia, por FIA, normalmente envolve a transformação do íon amônio em amônia gasosa a qual permeia por uma membrana de difusão gasosa antes da detecção condutométrica.<sup>23-26</sup> O presente trabalho objetivou o desenvolvimento de metodologia analítica para avaliação da atividade enzimática da urease no solo, a partir da quantificação do íon amônio, produto da reação enzimática, utilizando análise por injeção em fluxo com difusão gasosa e detecção condutométrica.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Amostragem de solo

A metodologia proposta foi aplicada na avaliação da atividade da urease em amostras de LATOSSOLO VERMELHO Distrófico,<sup>27</sup> de uma área com vegetação nativa do bioma cerrado (18°44'56.6"S 47°30'49.7"W), no mês de outubro de 2017. Foram selecionadas cinco parcelas de 100 m<sup>2</sup>, onde em cada parcela foram coletadas 10 sub amostras na

profundidade de 0 a 15 cm, homogêneas resultando em 5 amostras compostas (500 g por amostra composta; identificadas: A1, A2, A3, A4 e A5), que foram armazenadas sob refrigeração à 2,0 °C até o momento da análise.

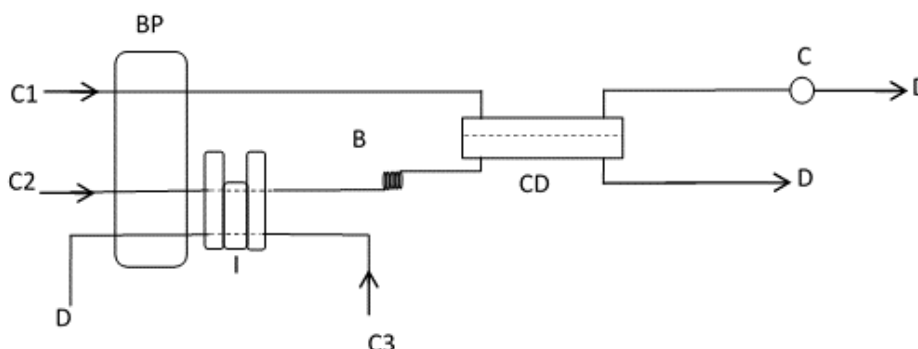
## 2.2. Avaliação da atividade da urease

Cinco amostras de solo foram incubadas segundo Souza,<sup>28</sup> com modificações. No solo fresco (malha 2,0 mm; 10,0 g) foram adicionados a 5,0 mL de solução de ureia (4,8 g L<sup>-1</sup>). Em seguida a mistura foi incubada a 37 °C, sob agitação, durante uma hora. Amostras de solo fresco, sem adição de solução de ureia também foram incubadas utilizando as mesmas condições. Após incubação, a reação

foi interrompida com a adição de 10,0 mL da solução KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup> e HCl 10,0 mmol L<sup>-1</sup>. As suspensões foram filtradas, e o extrato aquoso foi utilizado para determinação da concentração de íon amônio pelo método de análise por injeção em fluxo com detecção condutimétrica-FIA/CE<sup>29,30</sup> e pelo método colorimétrico adaptado de Martins.<sup>31,32</sup>

## 2.3. Análise por injeção em fluxo FIA-CE

A concentração do íon amônio do extrato aquoso, foi determinada pela análise por injeção em fluxo, utilizando o sistema em fluxo descrito na Figura 1. As soluções foram bombeadas usando a bomba peristáltica Minipuls 3 Gilson e tubos de Tygon®.



**Figura 1.** Sistema de análise por injeção em fluxo proposto para determinação de amônia gerada pela catálise da ureia pela urease no solo. I, injetor comutador; C<sub>1</sub>, solução receptora (água deionizada); C<sub>2</sub>, solução transportadora (NaOH); C<sub>3</sub>, solução padrão ou extrato da amostra de solo; BP, bomba peristáltica; B, reator helicoidal; CD, câmara de difusão de gás; C, condutivímetro; D, descarte

Foram avaliados os parâmetros hidrodinâmicos, vazão da solução transportadora/receptora (0,4; 0,9 e 1,2 mL min<sup>-1</sup>) e volume da alça de amostragem (77; 132 e 187 µL) de forma univariada. A concentração do NaOH na solução receptora (1,0; 10,0; 100,0 e 200,0 mmol L<sup>-1</sup>) também foi avaliada. A avaliação dos parâmetros hidrodinâmicos e da concentração do NaOH na solução receptores foi realizada com

solução padrão de sulfato de amônio 1,6 mmol L<sup>-1</sup>.

A concentração de amônia produzida pela enzima presente na amostra de solo, foi determinada na forma de íon amônio, por curva analítica, onde foram preparadas soluções padrões de sulfato de amônio em triplicata (0,4; 0,8; 1,2; 1,6 e 2,0 mmol L<sup>-1</sup> e 0,01; 0,03; 0,05; 0,07; 0,09 e 0,11 mmol L<sup>-1</sup> de íon NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, para o método FIA/CE e colorimétrico, respectivamente).

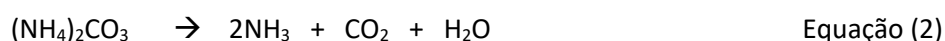
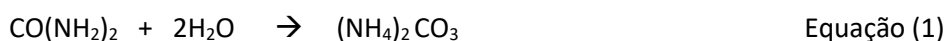
## 2.4. Análise colorimétrica

O íon amônio, presente no extrato de solo, também foi determinado pelo método colorimétrico, utilizando o kit K047 (Bioclin®, Brasil).<sup>31,32</sup> Foram adicionados 1,0 mL do oxidante (50 mL do reagente oxidante contendo Hidróxido de Sódio 1,5 mol L<sup>-1</sup> e Hipoclorito de Sódio 10,0 mmol L<sup>-1</sup>, diluído em 450,0 mL de água) e 1,0 mL de solução trabalho (25,0 mL Tampão Fosfato, pH = 7,50 e concentração 100 mmol L<sup>-1</sup>, nitroprussiato de sódio 5,0 mmol L<sup>-1</sup>, salicilato de sódio 300,0 mmol L<sup>-1</sup>, estabilizantes e conservantes, em 100,0 mL de água). Também foram adicionados 100 µL de extrato de solo previamente diluído (100 µL de extrato e 100µL de água deionizada) e água deionizada originando um volume final de 2,5 mL de solução de leitura. O frasco reacional foi deixado em repouso por 15 minutos, e em seguida a absorbância a 600 nm, foi lida em espectrofotômetro da FEMTO, 700 Plus, em cubeta de vidro, caminho ótico de 10 mm, capacidade de 2,0 mL.

## 3. Resultados e Discussão

O solo possui, dentre outras enzimas, a urease, responsável pela hidrólise da ureia, que é convertida em carbonato de amônio; este composto, por sua vez, desdobra-se facilmente em gás NH<sub>3</sub> (amônia), CO<sub>2</sub> e água (Equação 1 e 2).

A atividade enzimática pode ser expressa em unidade de atividade cujo símbolo é U, a qual é definida como sendo a quantidade de enzima que catalisa o consumo do substrato ou a formação do produto. Assim, a atividade da uréase no solo pode ser avaliada pela determinação da variação da concentração da amônia, produto da hidrólise da ureia, em relação ao tempo de incubação e quantidade de solo. Em específico, para uréase no solo, a sua atividade foi avaliada pela concentração do íon amônio produzida pela catálise enzimática, por massa de solo e por unidade de tempo, sendo expressa em mg de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

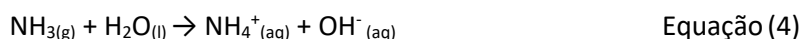
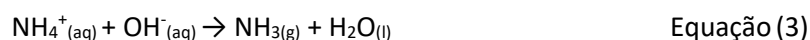


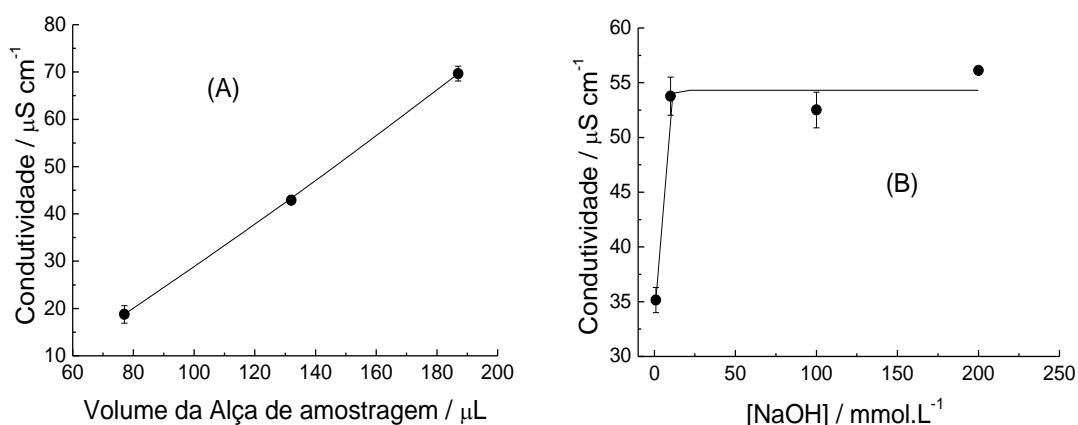
A concentração do íon amônio foi determinada por dois métodos, FIA-CE (método proposto neste trabalho) e pelo método colorimétrico.<sup>31,32</sup>

A resposta condutométrica do íon amônio produzido pela enzima, foi avaliado no sistema em fluxo descrito na Figura 1. Tal sistema baseia-se na reação do íon amônio com hidróxido de sódio para formação de amônia gasosa (equação 3) que permeia através de membrana polimérica de

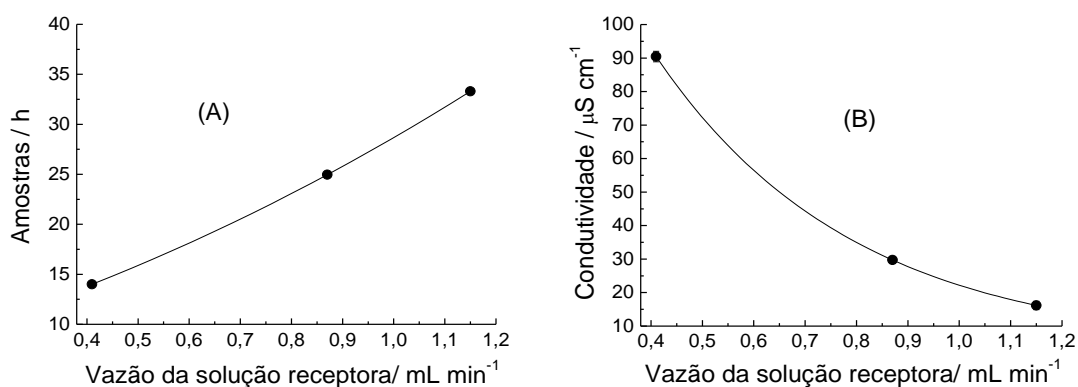
politetrafluoretileno (PTFE). A amônia difundida pela membrana reage com a água (equação 4), dissociando-se em íons que são monitorados por condutividade elétrica, sendo o valor da condutividade elétrica, proporcional à concentração do íon amônio.

Foram avaliados os parâmetros hidrodinâmicos (Figura 2 e 3) do sistema FIA de modo a investigar as melhores condições para a resposta condutométrica





**Figura 2.** Resposta condutométrica em função do volume da alça de amostragem (A), concentração de NaOH (B). Vazão da solução transportadora de  $0,9 \text{ mL min}^{-1}$ ; Solução padrão de sulfato de amônio,  $1,6 \text{ mmol L}^{-1}$  e reator helicoidal com  $0,8 \text{ mm}$  de di x  $85 \text{ cm}$  de comprimento.



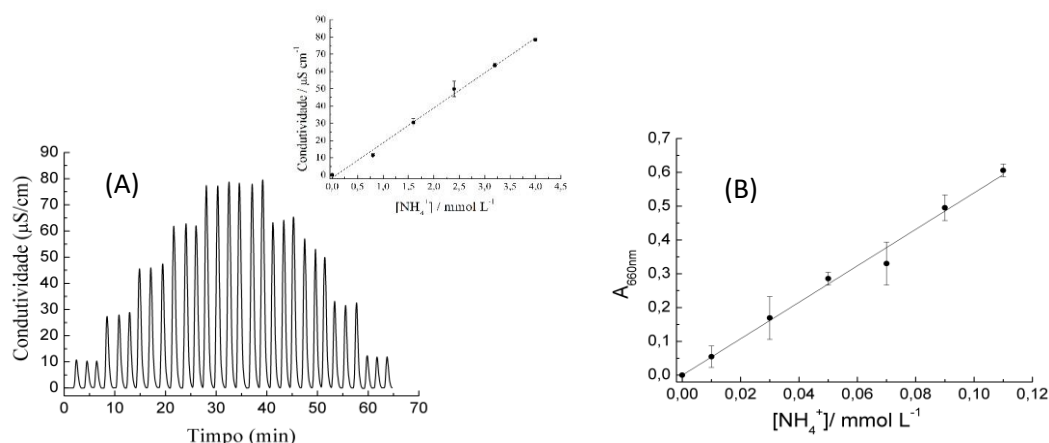
**Figura 3.** Frequência de amostragem (A) e resposta condutométrica em função da vazão da solução receptora (B). Condições: Solução padrão de sulfato de amônio,  $1,6 \text{ mmol L}^{-1}$  e reator helicoidal com  $0,8 \text{ mm}$  de di x  $85 \text{ cm}$  de comprimento.

Os parâmetros do sistema em fluxo foram estabelecidos, observando a magnitude do sinal analítico (resposta de condutividade elétrica) aliado a estabilidade da linha base, sensibilidade e frequência de amostragem. Valores de alça de amostragem maiores que  $187 \mu\text{L}$  repercutem em menor frequência analítica. Foram estabelecidos  $187 \mu\text{L}$ ,  $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $1,15 \text{ mL min}^{-1}$  para o volume de amostragem, concentração da solução de NaOH e vazão da solução receptora, respectivamente. A vazão da solução receptora foi estabelecida em função de uma maior frequência analítica.

Após avaliação dos parâmetros de fluxo, soluções de concentrações crescentes do padrão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  foram injetadas em triplicata no sistema FIA. Deste modo, foi possível obter alguns parâmetros de confiabilidade analítica, como sensibilidade, faixa linear, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão (recuperação) e precisão (repetibilidade). Na sequência deste estudo, os extratos aquosos de cinco amostras de solo sob vegetação nativa do bioma cerrado foram avaliados em triplicata, pelo método FIA-CE e colorimétrico por meio da interpolação das respectivas respostas

analíticas nas curvas analíticas de calibração (externa). Na figura 4 estão representados a resposta condutométrica (CE) para o método FIA-CE e sua respectiva curva analítica (figura 4A) e a curva analítica para o método colorimétrico (figura 4B). A partir destes resultados, foram calculadas as seguintes equações de reta: CE ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) =  $20,3 [\text{NH}_4^+]$  ( $\text{mmol L}^{-1}$ ) – 1,68 ( $R = 0,994$ ) para o método FIA-CE; e  $A = 5,5[\text{NH}_4^+]$  ( $\text{mmol L}^{-1}$ ) + 0,00197 ( $R = 0,999$ ) para o método colorimétrico. A faixa

linear apresentada pelo método FIA-CE (de 0,07 a  $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) foi superior a faixa apresentada pelo método colorimétrico ( $0,0033$  a  $0,110 \text{ mmol L}^{-1}$ ), sendo interessante pois a concentração de amônio gerada pela atividade enzimática no solo é relativamente elevada, amenizando erros provocados por diluições dos extratos de solo, caso seja necessário. Todos estes parâmetros analíticos são apresentados na Tabela 1.



**Figura 4.** Resposta condutométrica de soluções de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e curva analítica para o método FIA-CE (A); curva analítica do método colorimétrico (B).

**Tabela 1.** Parâmetros Analíticos do método FIA-CE e Colorimétrico

	FIA-CE	Colorimétrico
Faixa linear ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	0,07 – 4,0	0,0033 – 0,110
Coefficiente de correlação, R	0,998	0,999
Limite de detecção ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	0,02	0,0011
Limite de quantificação ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	0,07	0,0033
Exatidão, (%)	94,7	102,8
Precisão, CV (%)	5,3	2,5
Sensibilidade, S	$20,3 \text{ mS cm}^{-1} \text{ mmol}^{-1} \text{ L}$	$5,5 \text{ U.A mmol}^{-1} \text{ L}$
Tempo de resposta (s)	42	----
FAT (amostras $\text{h}^{-1}$ )	28	----

LD =  $3 \times \text{DPB} / S$ , LQ =  $10 \times \text{DPB} / S$ , DPB: desvio padrão da resposta analítica do branco; CV =  $(\text{DP} / [\text{NH}_4^+]_{\text{média}}) \times 100$ , onde DP: Exatidão =  $([\text{NH}_4^+]_{\text{média experimental}} / [\text{NH}_4^+]_{\text{teórica}}) \times 100$ ; Desvio padrão; S: Sensibilidade calculada a partir da inclinação da curva analítica<sup>33</sup>; FAT: Frequência Analítica Teórica.<sup>34</sup>



Na Tabela 1 também pode ser comparado o desempenho entre o método FIA-CE e o método colorimétrico em função dos parâmetros analíticos apresentados para determinação do íon amônio. Observa-se que o método proposto (FIA-CE) apresentou uma maior sensibilidade, ou seja, maior mudança na resposta avaliada (Condutividade elétrica) em relação a resposta do método colorimétrico frente a variação da concentração do íon amônio. No entanto, o método FIA-CE apresentou um limite de detecção maior que o método colorimétrico, o que não inviabiliza sua utilização para avaliação da atividade da uréase.

O método proposto neste trabalho, apresentou elevada frequência analítica quando comparado com o método colorimétrico, que demanda um tempo de reação para formação de complexo colorido para posterior quantificação, por espectrometria UV-Vis, do íon amônio gerado pela enzima no solo. Todas estas vantagens do método FIA-CE também se sobressaem quando este é comparado ao método que determina o nitrogênio total por destilação com arraste de vapor e posterior quantificação por titulação.

Utilizando a resposta de condutividade solução de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a  $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $1,2 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $0,07 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $0,11 \text{ mmol L}^{-1}$ , estimou-se a precisão do método FIA CE e colorimétrico, respectivamente. A precisão do método proposto (CV= 5,3 %) não foi maior que a precisão apresentada pelo método colorimétrico (CV= 2,5 %), no entanto, o método FIA CE é considerado preciso para os níveis de concentração avaliados.<sup>35</sup>

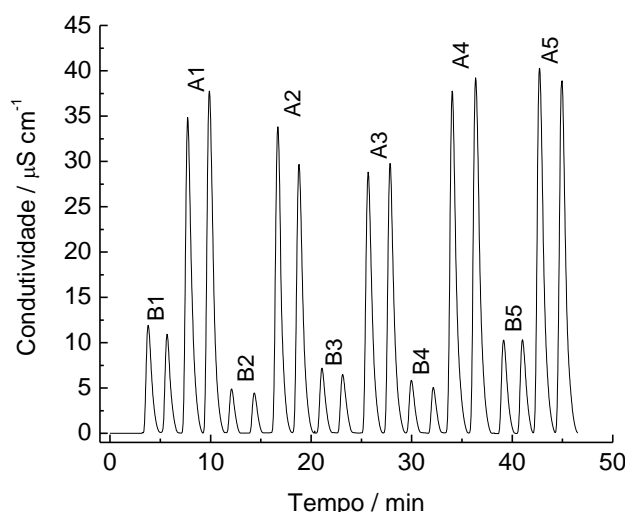
Na Tabela 1 também pode ser verificado pelo valor da sensibilidade (S) que o método proposto apresentou sensibilidade menor que o método colorimétrico. No entanto, esta característica analítica não se trata de um inconveniente e também não resulta em prejuízo na avaliação da atividade da urease

no solo. O método FIA-CE, apesar de menos sensível, proporcionou uma frequência analítica maior que o método colorimétrico (demanda de um tempo de reação para formação de complexo colorido para posterior quantificação do íon amônio gerado pela enzima no solo). O método FIA-CE mostrou sensibilidade maior que o método que determina a atividade enzimática pelo teor de Nitrogênio total por arraste de vapor seguido por titulação.<sup>14</sup>

A eficiência do método FIA-CE foi avaliada para a determinação da atividade da uréase em cinco amostras (identificadas: A1, A2, A3, A4 e A5) de solo sob vegetação nativa do bioma cerrado. A resposta condutométrica para os extratos de solo com e sem a presença do substrato (ureia) na etapa de incubação estão apresentados na figura 5.

O picos identificados como A1, A2, A3, A4 e A5, são referentes a resposta de condutividade da concentração de íons  $\text{NH}_4^+$ , gerado pela enzima urease após a adição do substrato de ureia em função do tempo de incubação, somado a resposta de condutividade referente a concentração de íons  $\text{NH}_4^+$ , já existente no solo que foi incubado. Subtraindo as alturas de pico das amostras incubadas com o substrato ureia, das alturas de picos das suas respectivas amostras sem adição do substrato ureia (B1, B2, B3, B4 e B5), obtém-se a concentração de íons  $\text{NH}_4^+$ , gerado pela enzima durante o período de incubação, ou seja, a variação da concentração do produto da reação enzimática em função do tempo que corresponde a atividade da enzima uréase presente nas amostras de solo, cujos os resultados estão apresentados na tabela 2. Com o objetivo de validar os resultados obtidos pelo método proposto FIA CE, a atividade da urease nas amostras também foi determinada por um método já descrito na literatura, utilizado na determinação da atividade a urease no solo,<sup>31,32</sup> e os resultados também estão apresentados na tabela 2.





**Figura 5.** Resposta condutométrica de extratos de amostras de solo vegetação nativa do cerrado com adição de solução de ureia (A) e sem adição de solução de ureia (B) no procedimento de incubação

**Tabela 2.** Comparação entre os resultados da determinação da atividade da uréase em amostras de solo sob vegetação nativa do bioma cerrado pelo método proposto e colorimétrico

	FIA-CE	Colorimétrico
Amostra	A.E. (mg Kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) *	A.E. (mg Kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )*
A1	38,7 ± 5,4	30,8 ± 3,2
A2	18,3 ± 8,7	31,4 ± 2,1
A3	28,3 ± 2,2	18,6 ± 3,4
A4	40,8 ± 2,6	32,7 ± 1,4
A5	40,6 ± 2,3	31,1 ± 2,2

A.E.: Atividade enzimática da urease obtidas pela variação da concentração de íon amônio gerado pela enzima, por massa de solo por hora de incubação. \*Média ± DPR (n=3)

Os resultados da atividade da urease nas amostras de solo obtidos pelo método FIA-CEA e pelo método colorimétrico foram submetidos aos teste F, onde as razões das variâncias do conjunto das análises para a metodologia proposta em relação ao método colorimétrico ( $F_{\text{calculado}} = S_{\text{proposto}}^2 / S_{\text{Colorimétrico}}^2$ ) foi de 2,86, sendo este valor inferior ao  $F_{\text{crítico}}$ , 6,39 ao nível de confiança de 95 %, indicando

que a precisão entre os dois métodos são estatisticamente iguais, com 95 % de confiabilidade. Objetivando comparar a média foi realizado o teste t, para amostras independentes, onde o  $t_{\text{calculado}}$  foi de 0,86 inferior ao  $t_{\text{tabelado}} = 2,31$  a um nível de confiança de 95 %, indicando que as médias obtidas pelos dois métodos (Tabela 3) são iguais dentro do nível de confiança do teste.

**Tabela 3.** Atividade média da urease no solo determinada pelos dois métodos

Método	Atividade da Urease (mg Kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
FIA-CE	29,0a
Colorimétrico	33,4a

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de t, para amostras independentes a 5 % de probabilidade (n=5)

#### 4. Conclusão

Este trabalho demonstrou o método simples e rápido para determinação da atividade da urease no solo, utilizando análise por injeção em fluxo, difusão gasosa e detecção condutométrica do íon amônio. O sistema em fluxo com detecção condutométrica proporcionou maior sensibilidade (20,3  $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ mmol}^{-1} \text{ L}$ ) e frequência analítica (28 amostras.  $\text{h}^{-1}$ ), faixa linear de trabalho 0,07 a 4,0  $\text{mmol L}^{-1}$ , com LD de 0,02  $\text{mmol L}^{-1}$  e LQ de 0,07  $\text{mmol L}^{-1}$ , com coeficiente de variação de 5,3 % e recuperação de 94,7 % indicando precisão e exatidão aceitáveis para nível de concentração avaliado. Os resultados da atividade da urease de amostras de solo, determinada pelo método proposto (FIA CE) e pelo método colorimétrico, confirmaram pelo teste F e pelo teste t que o método FIA CE possuem desempenho similar, quanto a precisão e exatidão e portanto poderá ser aplicada na avaliação da atividade da urease no solo como um dos parâmetros de bioindicação da qualidade do solo.

#### Referências Bibliográficas

- Peixoto, R. S.; Chaer, G. M.; Franco, N.; Reis Junior, F. B.; Mendes, I. C.; Rosado, A. S. A Decade of Land Use Contributes to Changes in the Chemistry, Biochemistry and Bacterial Community Structures of Soils in the Cerrado. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2010**, *98*, 403. [CrossRef]
- Lisboa, B. B.; Vargas, L. K.; Silveira, A. O. Da; Martins, A. F.; Selbach, P. A. Indicadores Microbianos de Qualidade Do Solo Em Diferentes Sistemas de Manejo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* **2012**, *36*, 33. [CrossRef]
- Mendes, I. de C.; Sousa, D. M. G. de; Junior, F. B. dos R. Bioindicadores de Qualidade de Solo: Dos Laboratórios de Pesquisa Para o Campo. *Cadernos de Ciência & Tecnologia* **2015**, *32*, 185. [Link]
- Menta, C.; Conti, F. D.; Pinto, S.; Bodini, A. Soil Biological Quality Index (QBS-Ar): 15 Years of Application at Global Scale. *Ecological Indicators* **2018**, *85*, 773. [CrossRef]
- Aon, M.; Colaneri, A. C. II. Temporal and Spatial Evolution of Enzymatic Activities and Physico-Chemical Properties in an Agricultural Soil. *Applied Soil Ecology* **2001**, *18*, 255. [CrossRef]
- Deng, S. P.; Tabatabai, M. A. Effect of Cropping Systems on Nitrogen Mineralization in Soils. *Biology and Fertility of Soils* **2000**, *31*, 211. [CrossRef]
- Paz-Ferreiro, J.; Trasar-Cepeda, C.; Leir??s, M. C.; Seoane, S.; Gil-Sotres, F. Effect of Management and Climate on Biochemical Properties of Grassland Soils from Galicia (NW Spain). *European Journal of Soil Biology* **2010**, *46*, 136. [CrossRef]
- Tan, X.; Xie, B.; Wang, J.; He, W.; Wang, X.; Wei, G. County-Scale Spatial Distribution of Soil Enzyme Activities and Enzyme Activity Indices in Agricultural Land: Implications for Soil Quality Assessment. *The Scientific World Journal* **2014**, ID 535768. [CrossRef]

- <sup>9</sup> Bowles, T. M.; Acosta-Martínez, V.; Calderón, F.; Jackson, L. E. Soil Enzyme Activities, Microbial Communities, and Carbon and Nitrogen Availability in Organic Agroecosystems across an Intensively-Managed Agricultural Landscape. *Soil Biology and Biochemistry* **2014**, *68*, 252. [[CrossRef](#)]
- <sup>10</sup> Upadhyay, L. S. B. Urease Inhibitors: A Review. *Indian Journal of Biotechnology*. **2012**, *11*, 381. [[Link](#)]
- <sup>11</sup> Bååth, E. Effects of Heavy Metals in Soil on Microbial Processes and Populations (a Review). *Water, Air, and Soil Pollution* **1989**, *47*, 335. [[CrossRef](#)]
- <sup>12</sup> Lipińska, A.; Kucharski, J.; Wyszowska, J. Urease Activity in Soil Contaminated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Polish Journal of Environmental Studies* **2013**, *22*, 1393. [[Link](#)]
- <sup>13</sup> Shen, G.; Lu, Y.; Hong, J. Combined Effect of Heavy Metals and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Urease Activity in Soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2006**, *63*, 474. [[CrossRef](#)]
- <sup>14</sup> Longo, R. M.; d e Melo, W. J. Hidrólise Da Uréia Em Latossolos: Efeito Da Concentração de Uréia, Temperatura, PH, Armazenamento e Tempo de Incubação. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* **2005**, *29*, 651. [[CrossRef](#)]
- <sup>15</sup> Yan, J.; Quan, G.; Ding, C. Effects of the Combined Pollution of Lead and Cadmium on Soil Urease Activity and Nitrification. *Procedia Environmental Sciences* **2013**, *18*, 78. [[CrossRef](#)]
- <sup>16</sup> Hu, B.; Liang, D.; Liu, J.; Lei, L.; Yu, D. Transformation of Heavy Metal Fractions on Soil Urease and Nitrate Reductase Activities in Copper and Selenium Co-Contaminated Soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2014**, *110*, 41. [[CrossRef](#)]
- <sup>17</sup> Lanna, A. C.; da Silveira, P. M.; da Silva, M. B.; Ferraresi, T. M.; Kliemann, H. J. Atividade de Urease No Solo Com Feijoeiro Influenciada Pela Cobertura Vegetal e Sistemas de Plantio. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo* **2010**, *34*, 1933. [[CrossRef](#)]
- <sup>18</sup> Miranda, C. E. S.; Carrilho, E.; Gervasio, A. P.; Giné, M. F. Sistemas Interfaceados de Análise Por Injeção Em Fluxo e Eletroforese Capilar (FIA - CE): Desafios, Aplicações e Perspectivas. *Química Nova* **2002**, *25*, 412 [[CrossRef](#)]
- <sup>19</sup> Ramdzan, A. N.; Mornane, P. J.; McCullough, M. J.; Mazurek, W.; Kolev, S. D. Determination of Acetaldehyde in Saliva by Gas-Diffusion Flow Injection Analysis. *Analytica Chimica Acta* **2013**, *786*, 70. [[CrossRef](#)]
- <sup>20</sup> Spinks, T. L.; Pacey, G. E. Utilization of Adsorption-Immobilized Urease in Gas-Diffusion Flow Injection. *Analytica Chimica Acta* **1990**, *237*, 503. [[CrossRef](#)]
- <sup>21</sup> Silva, F. V.; Nogueira, A. R. A.; Souza, G. B.; Reis, B. F.; Araújo, A. N.; Montenegro, M. C. M. B. S.; Lima, J. L. F. C. Potentiometric Determination of Urea by Sequential Injection Using Jack Bean Meal Crude Extract as a Source of Urease. *Talanta* **2000**, *53*, 331. [[CrossRef](#)]
- <sup>22</sup> Timofeeva, I. I.; Bulatov, A. V; Moskvina, A. L.; Kolev, S. D. A Gas-Diffusion Flow Injection Method Coupled with Online Solid-Liquid Extraction for the Determination of Ammonium in Solid Samples. *Talanta* **2015**, *142*, 140. [[CrossRef](#)]
- <sup>23</sup> Coelho, N. M. M.; Andrade, J. C.; Cantarella, H. Determinação de Amônio e Nitrato Em Solos Por Injeção Em Fluxo, Pelo Método Difusão-Conductividade. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* **1992**, *16*, 325. [[Link](#)]
- <sup>24</sup> Borges, S. S.; Acevedo, M. S. M. S. F.; Korn, M. Sistema Multicomutado de Análise Em Fluxo Para Determinação de Amônio e Monocloramina Em Águas Residuais e Produtos de Desinfecção. *Química Nova* **2009**, *32*, 1175. [[CrossRef](#)]
- <sup>25</sup> Kamogawa, M. Y.; Estadual, U.; Grosso, D. M.; Itahun, R. D.; Ms, D. Autoamostrador de Baixo Custo Para Análise Por Injeção Em Fluxo . *Química Nova* **2009**, *32*, 1644. [[CrossRef](#)]
- <sup>26</sup> Jaikang, P.; Grudpan, K.; Kanyanee, T. Conductometric Determination of Ammonium Ion with a Mobile Drop. *Talanta* **2015**, *132*, 884. [[CrossRef](#)]

- <sup>27</sup> dos Santos, H. G.; Jacomine, P. K. T.; dos Anjos, L. H. C.; de Oliveira, V. A.; Lumbreiras, J. F.; Coelho, M. R.; Almeida, J. A. D. E.; Cunha, T. J. F.; de Oliveira, J. B.; *Sistema Brasileiro de Classificação de Solos*, 3a ed., Embrapa: Brasília, 2013. [[Link](#)]
- <sup>28</sup> Sousa, H. M.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Mato Grosso, 2014. [[Link](#)]
- <sup>29</sup> Ferreira, G. F. T.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Grande Dourados, 2013. [[Link](#)]
- <sup>30</sup> Pasquini, C.; de Faria, L. C. Flow-Injection Determination of Ammonia in Kjeldahl Digests by Gas Diffusion and Conductometry. *Analytica Chimica Acta* **1987**, *193*, 19. [[CrossRef](#)]
- <sup>31</sup> Martins, L. E.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Viçosa, 2015. [[Link](#)]
- <sup>32</sup> de Oliveira, S. M. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Uberlândia, 2012. [[Link](#)]
- <sup>33</sup> ANVISA. Ministério da Saúde-MS, Resolução – RE Nº 899, de 29 de Maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. [[Link](#)]
- <sup>34</sup> Backes, R. S.; Guedes, T. J.; Santos, W. T. P.; Rodrigo, A. B. *Química Nova* **2017**, *40*, 752. [[CrossRef](#)]
- <sup>35</sup> Wood, R. How to Validate Analytical Methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **1999**, *18*, 624. [[CrossRef](#)]