



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

Instituto de Ciências Biológicas



Prospecção de enzimas de solo de Cerrado sob cultivo de cana-de-açúcar

Luiza Luana Amorim Purcena

Goiânia

2014

Luiza Luanna Amorim Purcena

Prospecção de enzimas de solo de Cerrado sob plantio de cana-de-açúcar

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia da Universidade Federal de Goiás, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biologia

Linha de Pesquisa: Detecção, Produção e Caracterização de Moléculas e Materiais Bioativos

Linha de Pesquisa: Tecnologia Enzimática

Orientadora: Kátia Flávia Fernandes

Goiânia

2014

RESUMO

O crescente aumento na área destinada ao cultivo de cana-de-açúcar no Estado de Goiás reflete a importância econômica dessa monocultura na economia não só do Estado, mas também para o Brasil. No entanto, a conversão de áreas nativas em áreas destinadas à agricultura e o plantio de monoculturas devem ser monitorados uma vez que efeitos em características bioquímicas, biológicas e físico-químicas do solo em áreas cultivadas já foram relatados. Neste trabalho foi estudado o efeito do manejo orgânico (MO) e convencional (MC) em enzimas da classe das hidrolases e oxidoredutases em solos cultivados com cana-de-açúcar e os resultados foram comparados com os obtidos para o solo nativo do Cerrado. Foram quantificadas a atividade de fosfomonoesterases ácidas e alcalinas, β -glucosidases, peroxidases e polifenoloxidasas. Foram ainda avaliados parâmetros físico-químicos tais como textura, pH, teor de matéria orgânica, fósforo (P^+), cálcio (Ca^{2+}), potássio (K^+), magnésio (Mg^{2+}), alumínio (Al^{3+}), acidez total (H+Al), saturação de alumínio (m%), saturação de bases (V%), capacidade de troca catiônica (CTC) e as relações entre os teores de K/CTC, Ca/CTC, Mg/CTC, bem como as relações entre os teores dos seguintes cátions K/Mg, Ca/Mg, Ca/K. Foi testado ainda, o pH ótimo de fosfomonoesterases e de β -glucosidases e a análise de componente principal (APC) foi realizada para identificar quais variáveis estudadas permitem diferenciar os solos estudados. Foi observado que nos solos testados há tanto fosfomonoesterases ácidas quanto alcalinas, com predominância de sua forma ácida. O pH ótimo da fosfomonoesterase ácida foi o pH 5.0 e os fatores que mais interferiram na atividade enzimática foi o pH e a textura. O manejo não alterou a atividade fosfomonoesterase alcalina. No entanto, foi observada uma redução de cerca de 50% nos solos cultivados quando comparados com o solo nativo. No caso da β -glucosidase

foi observado que o pH ótimo da enzima foi 5.5 no solo sob MC e o solo sob MO e o solo nativo apresentou atividade enzimática ótima na faixa de pH entre 6.0 e 7.0. Foi ainda observado que para esta enzima, apenas o MC reduziu a atividade enzimática. pH e textura também foram os principais parâmetros físico-químicos que afetaram a atividade enzimática. Por fim, para peroxidase e polifenoloxidase também foi observada uma redução na atividade enzimática, tanto no solo sob MO quanto no MC. A redução na atividade da peroxidase foi cerca 57% e na atividade da polifenoloxidase de cerca 36% e o pH foi a característica que mais influenciou na atividade dessas enzimas. Dessa forma, observou-se que o manejo, em geral, afeta a atividade de enzimas presentes no solo e que o pH e textura são as principais características físico-químicas que interferem na atividade dessas enzimas.

Palavras-chave: Solo, enzimas, manejo, Cerrado, cana-de-açúcar

ABSTRACT

The increasing land area cultivated with sugarcane in Goiás reflects the economic importance of this monoculture not only to Goiás, but also to Brazil. However, the native areas of Cerrado converted to monoculture planting must be monitored since the effects in the biochemical, biological and physicochemical characteristics of soil have already been reported. In this study, the effect of organic (OM) and conventional management (CM) of sugarcane on hydrolases and oxidative enzymes and the results were compared to those for native soil of Cerrado (NS). It was quantified the activity of acid and alkaline phosphomonoesterases, β -glucosidases, peroxidases and phenol oxidases. It was also determined the physicochemical parameters such as granulometry (percentage of clay, silt and sand) and content of soil organic matter (SOM), pH, Inorganic phosphorus (P^+), calcium (Ca^{+2}), Potassium (K^+), Magnesium (Mg^{+2}), Aluminum (Al^{+3}), potential acidity total (H+Al) saturation in Aluminum (M%), saturation of alkalis (V%), cation exchangeable capacity (CEC) and the relationship between Ca/CEC, K/CEC and Mg/CEC content as well as the relationships of the cations Ca/K, Ca/Mg, Mg/K. The optimum pH was assayed for phosphomonoesterases and β -glucosidases. Principal component analyses was performed to identify which factors evaluated would permit to differentiate NS, OM and CM. The results showed the presence of both acid and alkaline phosphomonoesterases in NS, OM and CM; nevertheless, acid phosphomonoesterases were predominant. The optimum pH for acid phosphomonoesterase was pH 5.0 and the factors that most interfered on the enzyme activity were pH and granulometry. Sugarcane management did not affect alkaline phosphomonoesterase, in the contrary, acid phosphomonoesterase activity was reduced around 50% in the cultivated soils. For β -glucosidase it was

observed optimum pH for OM and CM at pH 5.5 and for NS, the enzyme presented higher activity in the pH range from 6.0 to 7.0. β -glucosidase have its activity reduced only in CM, OM and NS presented the same pH profile and similar enzyme activities. pH and granulometry were also the main factors correlated to β -glucosidase activity. Finally, for oxidative enzymes, it was also observed a reduction of enzyme activity in OM and CM in about 57% for peroxidase and 36% for phenol oxidase and pH was the crucial parameter affecting on these enzyme activities.

Keywords: Soil, enzymes, management, Cerrado, sugarcane

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1: Demanda e produção de biocombustíveis nos principais países produtores 17
- Figura 2: Mecanismo de ação da fosfodiesterase e fosmonoesterase envolvendo um rearranjo molecular (Reação A) e incorporação dos átomos de oxigênio (•) na molécula de fosfato (reação B e C) 23
- Figura 3: Hidrólise da celobiose, catalisada pela β -glicosidase 24
- Figura 4: Reação de hidrólise do catecol pela polifenoloxidase 29

CAPÍTULO 2

- Figura 1: A) Relationship between CP1 *versus* CP2 considering the scores for each physicochemical variables and for β -glucosidase. B) Relationship between CP1 *versus* CP2 considering the scores for the soil samples from each management and native soil. 77
- Figura 2: pH profile of β -glucosidase from Native soil, Organic Management and Conventional Management of sugarcane crop 78
- Figura 3: Conceptual model of interaction between β -glucosidase soil surface: the high density of charges of montmorillonite strongly avoid the adsorption; the lower charge density in kaolinite is more favorable for the enzyme adsorption; the positive charges of goethite are compensated by the presence of phosphate ions and adsorption mechanisms are similar to kaolinite mechanism 78

CAPÍTULO 3

- Figura 1: A) Relação entre a CP 1 *versus* CP2 considerando os pesos de cada variável testada no solo. B) Relação entre a CP1 *versus* CP2 considerando os pesos das diferentes amostras de solo. 88
- Figura 2: Efeito do manejo na atividade de peroxidase 91
- Figura 3: Atividade de polifenoloxidase nos diferentes manejos 92

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1: Classificação de polifenoloxidase de acordo com a Comissão de Enzimas da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC)	28
---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Principal Component loadings after Varmiax rotation. The soil parameters are grouped according to the maximum fittings to principal components (Correlation coefficients > 0.50; n=21)	74
--	----

Tabela 2: Amount of clay, silt, sand, SOM and pH in the cropped and native soils	75
--	----

Tabela 3: Values of ions and alkali saturation (V%) on cropped and native soils ...	76
---	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1: Descrição dos pesos das componentes principais 1 (CP1) e componentes principais 2 (CP2). Os fatores físico-químicos e atividade enzimática nos solos analisados são agrupados de acordo com o máximo de ajuste ao componente principal. (Coeficiente de correlação > 0.5; n=21)	85
---	----

Sumário

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 O SOLO	12
1.2 CANA-DE-AÇÚCAR	15
1.3 AGRICULTURA ORGÂNICA	18
1.4 ENZIMAS DE SOLO	20
1.4.1 FOSFATASES	20
1.4.2 GLICOSIDASES	23
1.4.3 OXIDORREDUTASES	26
2 OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivos Gerais.....	31
2.2 Objetivos Específicos.....	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Coleta do solo	32
3.2 Estudo bioquímico de enzimas do solo	32
FOSFATASES	32
GLICOSIDASES	33
OXIDORREDUTASES	34
3.3 Análises estatísticas	36
4 JUSTIFICATIVA	38

CAPÍTULO I: Artigo publicado no Journal of Agricultural and Food Chemistry: “Effects of Organic and Conventional Management of Sugar Cane Crop on Soil Physicochemical Characteristics and Phosphomonoesterase Activity”

I. APRESENTAÇÃO	42
Artigo.....	43

CAPÍTULO II: Artigo a ser submetido no periódico Journal of Agricultural and Food Chemistry: “Study of β -glucosidases and physicochemical factors from Cerrado soil under organic and conventional management of sugarcane crop”

I. APRESENTAÇÃO	53
Artigo	54

CAPÍTULO III: Efeito do manejo orgânico e convencional da cana-de-açúcar em oxidorreduções de solo do Cerrado

I. APRESENTAÇÃO	81
II. INTRODUÇÃO	84
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
IV. CONCLUSÃO	95
V. CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
VI. PERSPECTIVAS	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

1 INTRODUÇÃO

1.1 O SOLO

O solo é definido como uma coleção de corpos naturais, constituídos por partes sólidas, líquidas e gasosas que são tridimensionais e dinâmicos, formados por materiais minerais e orgânicos que ocupam a maior parte do manto superficial das extensões continentais do nosso planeta. Os solos contêm matéria viva e podem ser vegetados na natureza onde ocorrem e, eventualmente, terem sido modificados por interferências antrópicas (1).

Do ponto de vista ecológico e global, a particularidade principal do solo é a sua capacidade de possibilitar o crescimento das plantas, sustentando a produção primária contínua. Para sintetizar seus componentes celulares, as plantas precisam de elementos biogênicos, tais como o carbono, hidrogênio, oxigênio, enxofre, nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e, em quantidades menores, os chamados micronutrientes, como boro, ferro, manganês, molibdênio, cobalto, cloro, cobre e zinco (2).

O solo é um ecossistema complexo e o que o distingue de outras formações geológicas é a sua atividade biológica. Essa atividade biológica e os componentes que fazem parte dela podem ser mensuráveis o que permitem caracterizar o potencial biológico do solo. Dessa forma, pode-se inferir que as principais características desse ecossistema são determinadas tanto por fatores físicos quanto por fatores químicos e biológicos (2, 3).

Até os anos 60 a região dos Cerrados era considerada como marginal para a agricultura intensiva. Apenas as regiões com solos de maior fertilidade, tais como as regiões nos fundos de vales ou regiões com predominância de rochas básicas eram

cultivadas. A principal cultura plantada era o arroz de sequeiro e os campos nativos eram aproveitados para a criação extensiva de gado de corte (2).

O baixo aproveitamento agrícola dos solos do Cerrado se devia principalmente ao fato de que estes solos são geralmente ácidos e de baixa fertilidade natural. Porém, o fato da região apresentar relevos relativamente suaves que favorecem a mecanização agrícola constituía um atrativo para sua ocupação. Este processo intensificou-se principalmente a partir da mudança da capital federal para o planalto central. Uma boa variedade de solos de Cerrado foi incorporada rapidamente ao processo de agricultura comercial, sobretudo nas chapadas, a partir das tecnologias aplicadas nas últimas décadas. Este processo resultou em sistemas produtivos de monoculturas em larga escala, mecanizados e altamente dependentes de insumos químicos (1).

Atualmente os cerrados já contribuem com mais de 60% da produção de alimentos, além de abrigar 40% do rebanho bovino do país (2). Essa produção deriva de mais da metade dos 2 milhões de km² de área do Cerrado que foi transformada em pasto, agricultura *cash-crop* (culturas que são destinadas diretamente para o mercado, não sendo utilizadas para estocagem) e monoculturas (4, 5), sendo que uma das culturas que mais cresceu nessa região foi a da cana-de-açúcar (6).

Os maiores responsáveis por esse aumento da exploração do solo são a alta demanda alimentícia mundial e a necessidade de novas fontes de combustíveis. O etanol produzido a partir da cana-de-açúcar apresenta grande importância no mundo uma vez que é uma fonte viável aos combustíveis fósseis (7). Porém, o impacto das diferentes práticas de uso do solo nesse bioma ainda precisa ser melhor avaliado (8), principalmente considerando as alterações bioquímicas e biológicas ocorridas em consequência de uma longa exploração por monoculturas tais como a cana-de-açúcar, a soja, entre outras.

Isto porque o crescimento de áreas utilizadas para a produção agrícola é acompanhado pela utilização de defensivos agrícolas e a cultura de cana-de-açúcar requer uma grande quantidade desses agentes químicos para que a produção esteja protegida contra diferentes pragas (9). Além dos perigos aos seres humanos, nos aspectos ocupacionais, alimentares e de saúde pública, sabe-se que a introdução de defensivos agrícolas no ambiente pode provocar efeitos indesejáveis, tendo como consequência mudanças no funcionamento do ecossistema afetado (10). Os impactos na qualidade do solo representam um risco para a produção agrícola no futuro e essa preocupação vem recebendo destaque.

Vários autores relacionam a perda de fertilidade do solo sob plantio de monoculturas com o consumo prolongado dos nutrientes pelas plantas, além do uso massivo de defensivos agrícolas (4, 11, 12) que geram alterações no ecossistema natural. Existem muitos trabalhos que relatam o efeito de diferentes manejos sobre a qualidade do solo no que diz respeito à bioquímica, biologia e fatores físico-químicos (13-16). Dentre estes efeitos pode-se destacar a perda de carbono orgânico do solo quando o ecossistema natural é convertido em área para a agricultura (17). A presença de carbono orgânico no solo é uma característica importante para a qualidade deste recurso, pois está envolvido na determinação das suas características (8, 12, 18).

Nos dias atuais, devido à conscientização sobre problemas ambientais consequentes da exploração indiscriminada do solo do Cerrado, é cada vez maior a demanda de informações sobre a biologia e a bioquímica desse ecossistema, bem como, sobre o impacto da incorporação de grandes áreas em sistemas agrícolas intensivos. A identificação do impacto de monoculturas tais como a da cana-de-açúcar no Cerrado brasileiro deve ser avaliado e monitorado com o intuito de impedir, entre outros, a perda de fertilidade do solo.

1.2 CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar é uma planta monocotiledônea, alógama e perene, provavelmente originária das regiões da Indonésia e Nova Guiné. A cana-de-açúcar pertencente à família *Poacea* e foi introduzida no Brasil no período colonial. Desde então se transformou em uma das principais culturas da economia brasileira (19, 20). As cultivares utilizadas atualmente são híbridos interespecíficos, sendo que nas constituições genéticas participam as espécies *Saccharum officinarum*, *S. spontaneum*, *S. sinense*, *S. barberi*, *S. robustum* e *S. edule*.

A produção canavieira tem desempenhado um importante papel na economia brasileira, influenciando fortemente na balança comercial. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, açúcar e etanol (19).

De acordo com o IBGE, a produção nacional de cana-de-açúcar apresentou em 2013 um crescimento de 10% em relação a 2012, alcançando 737,9 milhões de toneladas. Neste mesmo ano, houve um aumento de 4,4% na área colhida e o rendimento médio aumentou 5,3% em consequência de uma maior renovação dos canaviais e pelas melhores condições climáticas nesse período. De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a previsão é que o Brasil produza até a safra de 2018/19, 47,34 milhões de toneladas de açúcar, o que corresponde a um acréscimo de 14,6 milhões de toneladas em relação ao período 2007/2008. Com relação às exportações, o volume previsto para 2019 é de 32,6 milhões de toneladas de açúcar exportados (19).

O etanol, produzido no Brasil, a partir da cana-de-açúcar, também conta com projeções positivas para os próximos anos, devido principalmente, ao crescimento do consumo interno e as demandas cada vez maiores do mercado externo do uso deste

biocombustível como alternativa energética (19). A produção projetada para 2019 é de 58,8 bilhões de litros, mais que o dobro da registrada em 2008. O consumo interno está projetado em 50 bilhões de litros e as exportações em 8,8 bilhões (19).

Na Região Centro-Oeste, os aumentos percentuais na produção de cana-de-açúcar também apontam para a expansão dos canaviais nos últimos anos. Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás apresentaram incrementos na produção de 18,1%, 8,4% e 18,8%, respectivamente. Goiás contribuiu com 9,2% da produção nacional em 2013 (21) e ocupa 4º posição em produção de cana-de-açúcar no Brasil e 1ª posição do Centro-Oeste.

Dentre as razões determinantes para o aumento na produção de cana-de-açúcar destaca-se questão da segurança energética. O aumento da população mundial e do consumo *per capita*, associados ao problema da mudança do clima ensejam a necessidade de ações mais coordenadas e sustentáveis, em seus aspectos ambientais, sociais e econômicos (6). De acordo com o Relatório do Balanço Energético Brasileiro publicado no site do Ministério de Minas e Energia em 2013 (22), o Brasil tem muito a contribuir no setor de bioenergia, pois possui uma matriz energética com 46% de fontes renováveis, com destaque para o etanol que contribui com 17,5%, num mundo em que apenas 20% de energia é produzida por fontes renováveis (23). Isto faz com que o Brasil apresente uma posição de destaque no cenário mundial, principalmente por sua forte estratégia em agro energia, que representa mais da metade dessa fonte renovável.

A figura 1 mostra a produção e a demanda de biocombustíveis no cenário mundial, incluindo a participação do Brasil nesse contexto.

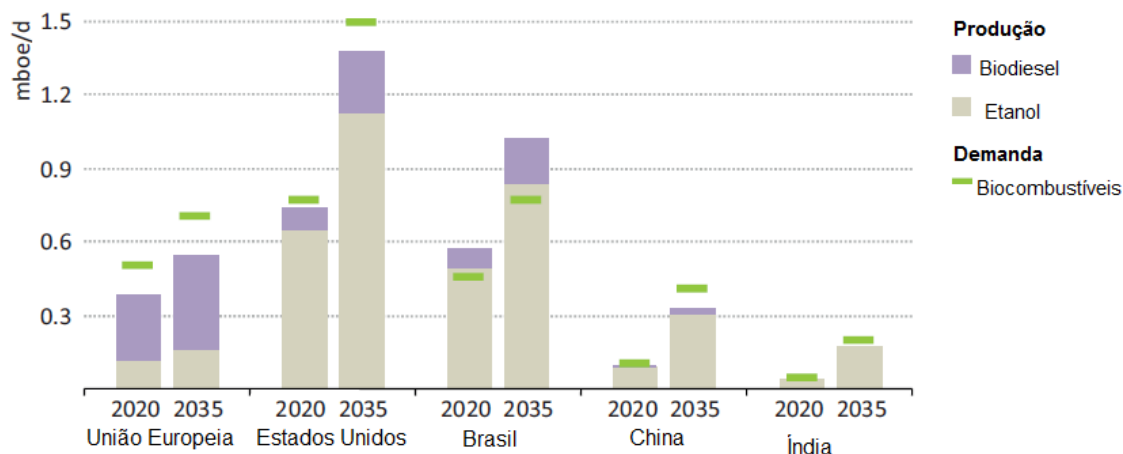


Figura 1: Demanda e produção de biocombustíveis nos principais países produtores.

Fonte: World Energy Outlook (International Energy Agency – IEA) (23).

Nesse cenário, dada a importância da cultura de cana-de-açúcar não só para o Brasil mas para a sustentabilidade energética mundial, o estudo do impacto desta monocultura sobre a qualidade do solo e, conseqüentemente, para o rendimento da produção reveste-se de grande importância.

Alguns estudos tem relatado a diminuição no rendimento da produção da cana-de-açúcar em decorrência da sua monocultura extensiva por um longo período de tempo (24-26). Estes estudos apontam para a diminuição da qualidade do solo devido à degradação de características químicas, biológicas e bioquímicas, visto que o aumento na produção canieira vem acompanhada com o aumento no uso de fertilizantes inorgânicos, defensivos agrícolas, além dos impactos causados pela maquinaria pesada, que causa compactação do solo. Além disso, em algumas regiões esse impacto ambiental é agravado pela prática da queima do canavial durante a época de colheita (5, 25-28).

Dessa forma, um acompanhamento mais pormenorizado dessa monocultura deve ser conduzido a fim de se detectar precocemente os efeitos sobre a qualidade do solo

desse bioma e contribuir para o desenvolvimento de metodologias que diminuam o impacto desta cultura nos solos do Cerrado.

1.3 AGRICULTURA ORGÂNICA

A preocupação com o uso sustentável do solo, assim como as políticas públicas para a adoção de manejos agrícolas mais sustentáveis, levou ao interesse de todo o mundo na agricultura orgânica.

De acordo com o MAPA, (19), na agricultura orgânica não é permitido o uso de substâncias que coloquem em risco a saúde humana e o meio ambiente e, neste sentido, na agricultura orgânica não são utilizados fertilizantes sintéticos solúveis, defensivos agrícolas e transgênicos. Para ser considerado orgânico, o produto tem que ser produzido em um ambiente onde se utiliza como base do processo produtivo os princípios agroecológicos que contemplam o uso responsável do solo, da água, do ar e dos demais recursos naturais, respeitando as relações sociais e culturais (19). O sistema de cultivo orgânico objetiva produzir culturas com o máximo de qualidade nutricional, preservando o meio ambiente e considerando a fertilidade do solo (29, 30).

Uma das grandes vantagens esperadas do manejo orgânico, além da qualidade do alimento produzido, é a redução dos impactos e, portanto, a preservação de características bioquímicas, tais como o carbono global, orgânico e basal (31, 32). No entanto, o impacto causado por esse tipo de manejo precisa ainda ser avaliado considerando outros aspectos bioquímicos assim como os aspectos biológicos.

Dentre os fatores biológicos, o tamanho da biomassa microbiana presente no solo também apresenta grande relevância para a conservação da fertilidade, uma vez que os micro-organismos são os maiores produtores de biomoléculas que compõem os

solos. Por isto há um grande interesse em entender quais fatores regulam a diversidade, o tamanho, a atividade e estrutura da biomassa microbiana dos solos (33-35).

Dentre os fatores bioquímicos, comumente avaliados para caracterizar a fertilidade dos solos, a detecção da atividade enzimática e o efeito do manejo nesses catalisadores despertam interesse uma vez que estes biocatalisadores estão envolvidos na biodisponibilização de nutrientes nesse ecossistema.

A biomassa e as enzimas presentes no solo são responsáveis por várias reações envolvidas na manutenção da qualidade deste ecossistema, tais como o ciclo de nutrientes, características físico-químicas e bioquímicas (34). Assim, o conhecimento acerca das mudanças na biomassa microbiana, bem como da atividade enzimática do solo permitem criar mecanismos para a detecção precoce da perda da fertilidade, bem como, propor metodologias para a remediação de solos degradados e, dessa forma, contribuir para o desenvolvimento de um manejo sustentável nas práticas agrícolas.

1.4 ENZIMAS DE SOLO

As enzimas desempenham um importante papel nos processos químicos e biológicos por meio da catálise de inúmeras reações. Apesar de ser difícil dizer conclusivamente qual a origem das enzimas do solo, uma vez que plantas e animais podem contribuir com o perfil enzimático de uma região, acredita-se que elas são principalmente de origem microbiana (36).

Dentre as enzimas que podem ser encontradas no solo destacam-se as hidrolases (α e β -glicosidases, ureases, desaminases, sulfatases, amidases, proteases, celulases) e oxidorreduções (polifenol oxidases, peroxidases) devido à importância dessas enzimas

na manutenção do ciclo de nutrientes, disponibilização de minerais como nitrogênio, fósforo e carbono, além da hidrólise de matéria orgânica (35, 37-39).

As atividades das enzimas do solo estão correlacionadas com o crescimento de plantas e são reportadas como uma importante ferramenta de medida da qualidade (40, 41), o que as torna grandes candidatas para atuarem como bioindicadores desse ecossistema. As enzimas são muito sensíveis às mudanças ambientais e podem ser mais adequadas como bioindicadores do que os micro-organismos, visto que menos de 1% dos micro-organismos do solo podem ser isolados e cultivados em laboratório (36). Deste modo, a capacidade de monitorar alterações do ecossistema sobre a microbiota se restringe a uma pequena fração passível de ser avaliada *in vitro*.

1.4.1 FOSFATASES

Fosfatases são enzimas que catalisam a hidrólise tanto de ésteres quanto de anidridos de ácido fosfórico (42) e de acordo com o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, podem ser classificadas em hidrolases fosfóricas monoéster ou fosfomonoesterases (EC 3.1.3), hidrolases fosfóricas diéster ou fofodiesterases (EC 3.1.4), hidrolases trifosfóricas monoéster (EC 3.1.5), enzimas que atuam sobre anidridos fosforil (EC 3.6.1) e enzimas que atuam em ligações P-N (EC 3.9). As fosfatases podem também ser subdivididas de acordo com sua regulação e a necessidade de metais para atividade catalítica (Mg^{2+} , Ca^{2+}) e a sensibilidade a inibidores (43).

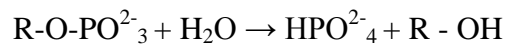
As fosfomonoesterases podem ser classificadas em ácidas, neutras, alcalinas, fosfoproteínas, fosfatases e fitases. As fosfomonoesterases ácidas, neutras ou alcalinas hidrolisam ligações de monoéster incluindo fosfatos de açúcar e nucleotídeos

(nucleotidasas). Já as fosfoproteínas fosfatases hidrolisam ligações fosfoéster de fosfoserinas, fosfotreoninas ou fosfotirosinas. Por fim, as fitases (EC 3.1.3.26 para 4-fitase e EC 3.1.3.8 para 3-fitase) hidrolisam todos os seis grupamentos fosfatos do inositol hexafosfato (43, 44). As fosfomonoesterases ácidas e alcalinas não hidrolisam fosfatos de ácido fítico (hexafosfato de *myo*-inositol) mas podem hidrolisar outros fosfatos de inositol (45).

Fosfodiesterases hidrolisam uma ou duas ligações fosfodiéster e incluem nucleases, que catalisam a hidrólise de ligações fosfodiésteres de ácidos nucléicos para produzir mononucleotídeos. Fosfolipases hidrolisam fosfolipídios e pirofosfatases inorgânicas (pirofosfato fosfohidrolase EC 3.6.1.1) hidrolisam fosfato a fósforo inorgânico (46).

Dentre as fosfatases de solo, as fosfomonoesterases são as mais comumente estudadas (15). Essas enzimas são em geral produzidas e secretados por plantas, bactérias e fungos, tendo como exceção as fosfatases alcalinas que não são produzidas em plantas superiores (47). As bactérias são as principais fontes de fosfomonoesterases alcalinas no solo enquanto fosfomonoesterases ácidas e fitases podem derivar de plantas, fungos e bactérias, sendo que os maiores produtores são fungos do gênero *Aspergillus*, *Emmericella* e *Penicillium* (43, 48). Tanto as fosfatases ácidas (pH ótimo 4,0 – 6,5) como as alcalinas (pH ótimo 9,0 – 10,0) têm sido as mais comumente encontradas no solo (49).

As fosfomonoesterase transformam o fósforo orgânico em inorgânico que é a forma passível de ser absorvida pelas plantas. Dessa forma, desempenham um importante papel, pois uma grande proporção do fósforo presente no solo está na forma orgânica e se tornam disponíveis após a mineralização que se dá por meio de hidrólise enzimática (50, 51), conforme mostrado na reação:



Provavelmente, as enzimas das classes das fosfodiesterases e fosfomonoesterases atuam de forma subsequente na mineralização do fósforo orgânico em inorgânico que assim podem ser utilizados por micro-organismos e plantas.

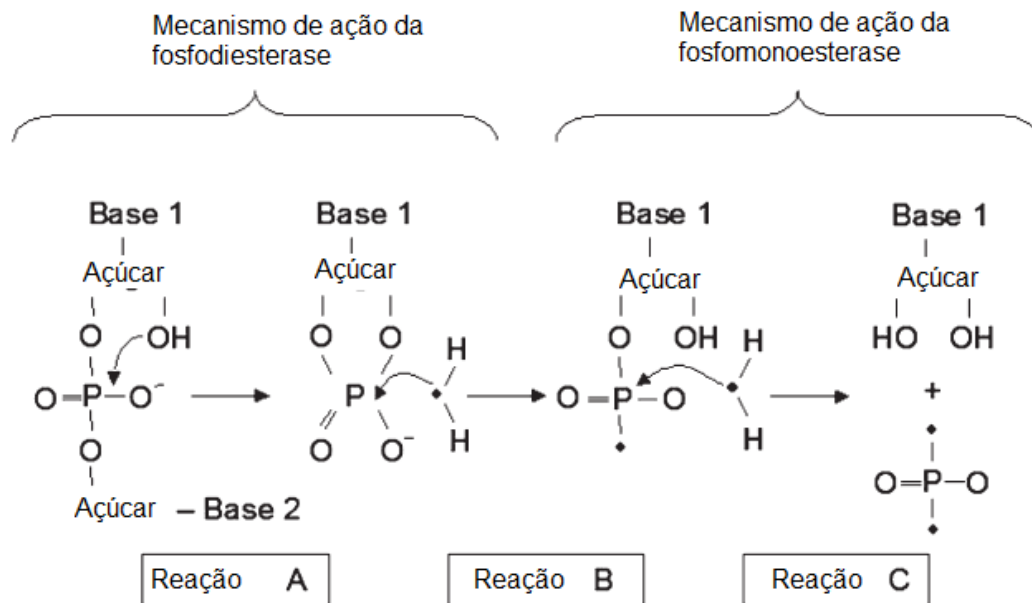


Figura 2: Mecanismo de ação da fosfodiesterase e fosfomonoesterase envolvendo um rearranjo molecular (Reação A) e incorporação dos átomos de oxigênio (•) na molécula de fosfato (Reações B e C). (52)

De modo geral, as fosfatases são mais encontradas na rizosfera que na massa do solo, o que sugere que desempenham um importante papel na nutrição de fósforo para a planta (44, 47).

1.4.2 GLICOSIDASES

Dentre as enzimas classificadas como celulolíticas as β -glicosidases despertam grande interesse devido seu importante papel em uma variedade de processos biológicos (53). As β -glicosidases (beta-D-glicosídeo glicohidrolase, EC 3.2.1.21) figuram entre as primeiras enzimas descobertas e mais estudadas devido à sua distribuição ubíqua e a grande variedade de substratos sobre os quais esta enzima atua (54).

Estas enzimas participam da cascata de hidrólise da celulose que compreende os seguintes eventos: as fibras de celulose são primeiramente clivadas por endoglucanases liberando pequenos fragmentos de celulose com extremidades redutoras e não redutoras que serão hidrolisadas subsequentemente por exoglucanases liberando oligossacarídeos de celobiose. Finalmente, a celobiose é hidrolisada em dois monômeros de glicose pelas β -glicosidases (55) (figura 3).

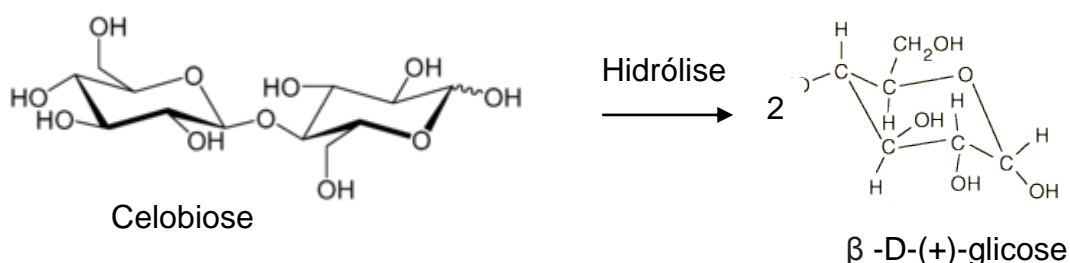


Figura 3: Hidrólise da celobiose, catalisada pela β -glicosidase.

O produto da reação, o monossacarídeo β -D-(+)-glicose, pode ser então absorvido e utilizado pelos micro-organismos como fonte de energia (56).

A β -glicosidase é uma das mais importantes glicosidases de solo, pois ao hidrolisar a celobiose, liberando dois mols de glicose, a β -glicosidase regula o suprimento de fontes de energia para micro-organismos que não são capazes de utilizar

diretamente a celobiose (57). Além da óbvia importância na disponibilização de glicose para a microbiota do solo, ao degradar a celobiose as β -glicosidases reduzem a inibição causada por este composto sobre certas celulases tais como a celobiohidrolase I de *Trichoderma reesei* (58)

As β -glicosidases são enzimas bem caracterizadas biologicamente. Além da ação sobre a celulose, as β -glicosidases catalisam a transferência de grupos glicosil entre nucleófilos de oxigênio. Essa reação de transferência resulta na hidrólise da ligação glicosídica entre os resíduos de carboidratos em aril-amino, ou alquil-beta-D-glicosídeos, glicosídeos cianogênicos, pequenas cadeias de oligossacarídeos e dissacarídeos sob condições fisiológicas, enquanto em condições definidas, pode ocorrer a síntese de ligações glicosil entre diferentes moléculas (59).

β -glicosidases são um grupo heterogêneo de enzimas e têm sido classificadas de acordo com vários critérios, de modo que não existe um único e bem definido método para classificação dessas enzimas. Em geral, dois métodos são citados na literatura: a especificidade pelo substrato e a identidade de acordo com a sequência de nucleotídeos (60).

De acordo com a especificidade com o substrato, essas enzimas podem ser classificadas em aril- β -glicosidases que atuam em aril-glicosídeos, celobioses verdadeiras, que hidrolisam a celobiose produzindo glicose e β -glicosidases com ampla especificidade por substratos, que atuam em um amplo espectro de substratos. A maioria das β -glicosidases fazem parte da última categoria (60).

O método mais aceito de classificação utiliza a sequência de nucleotídeos no gene dessa enzima e é baseado na similaridade da sequência de aminoácidos e no empacotamento da enzima (60). A sequência de nucleotídeos é uma classificação útil na caracterização de enzimas do ponto de vista estrutural, porém, a especificidade pelo

substrato ainda atua como o principal ou único parâmetro para caracterizar glicosidases não conhecidas (55).

Muitas das β -glicosidases em solo são hidrolases extracelulares originadas de fungos. *Aspergillus niger*, é um dos maiores produtores na natureza. Seu habitat natural é principalmente o solo e em camadas de folhas onde crescem aerobicamente na matéria orgânica (61). Os processos de degradação de restos de plantas envolvem um grande número de enzimas que trabalham em cascata. Assim, qualquer alteração em uma dessas enzimas gera um desequilíbrio no processo de decomposição e leva a um comprometimento na função de degradação e conseqüentemente, na qualidade do solo (62).

Neste sentido, as β -glicosidases desempenham um importante papel no ciclo do carbono no solo e os níveis de atividade dessa enzima têm sido sugeridos como indicador da qualidade de solo (30, 35, 39, 63, 64).

1.4.3 OXIDORREDUTASES

Polifenoloxidasas e peroxidases são enzimas oxidativas que no solo são produzidas principalmente por fungos e apresentam função de destaque na degradação de polímeros de lignina (65). Estas enzimas oxidativas são ainda produzidas por plantas para uma série de propósitos, incluindo ontogenia, defesa e obtenção de carbono e nitrogênio. As peroxidases e polifenoloxidasas são enzimas que mediam funções chave no ecossistema do solo, tais como a humificação, mineralização, quebra de carbono e exportação de carbono orgânico dissolvido (66), influenciando na acumulação de carbono recalcitrante no solo (67).

Duràn e colaboradores (1997) (67) realizaram uma revisão de peroxidases e polifenoloxidasas immobilizadas em diferentes suportes, incluindo montemorilonita e reportaram que essas enzimas são muito utilizadas na degradação e monitoramento de compostos fenólicos tóxicos em águas e solos.

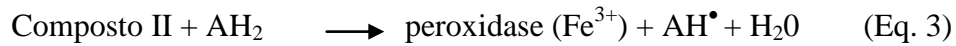
No entanto, poucos estudos têm sido feitos sobre fenoloxidasas e peroxidases de solo (66) e quais fatores desse ecossistema mais interferem na sua atividade, incluindo o manejo de culturas agrícolas.

Peroxidasas

Peroxidasas são enzimas que usam peróxido de hidrogênio como acceptor de elétrons (EC 1.11.1). No solo, fungos produzem manganês peroxidase (EC 1.11.1.13), lignina peroxidase (EC 1.11.1.14) entre outras variedades de peroxidases (EC 1.11.1.7) que são conhecidas por desempenhar papel na despolimerização da lignina. Além disso, o fato de plantas produzirem peroxidases faz com que sua presença seja proporcional à quantidade de matéria celulósica presente nesse ambiente.

A maioria dos ensaios de amostras de solo não discrimina a qual grupo fazem parte, e, portanto, o termo genérico peroxidase é utilizado para descrever enzimas que usam peróxido de hidrogênio como acceptor de elétrons (66).

O mecanismo das reações catalisadas pela peroxidase tem sido largamente estudado e já está bem estabelecido, podendo ser dividido em 3 etapas, representadas pelas Equações 1 a 3.



Na primeira etapa (Eq. 1), o grupo prostético heme da peroxidase, por exemplo o ferro [peroxidase(Fe⁺³)] sofre oxidação pela H₂O₂ (ou peróxidos orgânicos), perdendo dois elétrons, e resultando na formação de um intermediário instável, chamado Composto I, que consiste em um complexo ferro-oxiferril (Fe⁴⁺ =O) com um radical cátion π porfirina.

Na segunda etapa (Eq. 2), o radical cátion π porfirina recebe um elétron de um substrato orgânico reduzido (AH₂), produzindo um radical livre do substrato correspondente (AH[•]) e um intermediário heme-oxiferril conhecido como Composto II.

Na última etapa (Eq. 3), ocorre uma subsequente redução por um elétron do Composto II por uma segunda molécula de substrato reduzido (AH₂), resultando na recuperação da enzima nativa [peroxidase(Fe⁺³)] (Ruzgas et al., 1995; Goodwin et al., 1995)

A presença de peroxidases em solos é de grande importância não apenas pelo seu papel na decomposição da lignina presente na matéria orgânica, mas também por sua participação no processo de humificação e transformação de xenobióticos (68, 69), o que desperta grande interesse na possibilidade de atuarem como biorremediadores destes ecossistemas assim como bioindicadores da qualidade do solo.

Polifenoloxidasas

Enzimas que oxidam compostos fenólicos usando oxigênio são nomeadas de acordo com o substrato que atuam em: monofenol oxidase, catecol oxidase e difenol oxidase (70).

A Comissão de Enzimas da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) classifica essas enzimas em vários grupos conforme mostrado na tabela 1 (66).

Tablela 1: Classificação de polifenoloxidasas de acordo com a Comissão de Enzimas da IUPAC

Classificação	Grupo	Enzimas	Descrição
EC 1.10.3.1	o-difenol: oxigênio oxidorreduções	Tirosinases (catecol oxidases)	
EC 1.10.3.2	p-difenol: oxigênio oxidorreduções	Lacases	múltiplos átomos de cobre no centro de reação
EC 1.13.11	dioxigenases	Catecol dioxigenase	incorporam dois átomos de oxigênio ao substrato
EC 1.14.18	monofenol mono-oxigenases	Tirosinases, monofenol oxidases e lacases	um doador de elétron e incorporam um único oxigênio ao seu substrato

Como os ensaios de amostras de solo quantificam atividade de várias classes dessas enzimas, muitas vezes o termo genérico fenoloxidase é utilizado para descrever a atividade de enzimas que oxidam fenóis e consomem oxigênio (66).

As polifenoloxidasas catalisam a hidroxilação de monofenóis com oxigênio molecular e formam inicialmente o-bifenóis e então os convertem em o-quinonas por meio de desidrogenação (71) (figura 4).

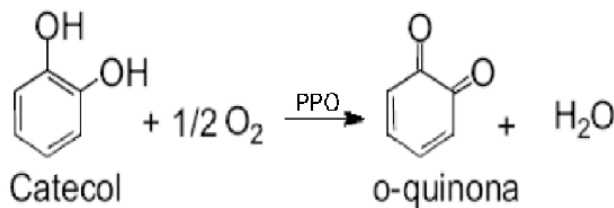


Figura 4: Reação de hidrólise do catecol pela polifenoloxidase.

As polifenoloxidases desempenham papel importante nas etapas iniciais de degradação da matéria orgânica que irá subsequentemente favorecer a atuação de outras enzimas na humificação, tais como a β -glicosidase. Dessa forma, considerando a importância dessa enzima para a reciclagem de nutrientes, bem como a possibilidade de sua aplicação como biorremediadores, torna-se importante avaliar o impacto das práticas agrícolas sobre sua atividade.

1.5 FATORES FÍSICO-QUÍMICOS DO SOLO

1.5.1 Textura

A textura é uma característica importante no manejo dos solos, pois determina, em grande parte, o grau de coesão e adesão entre as partículas do solo. Os teores relativos das partículas do solo influenciam na taxa de infiltração e retenção de água, na aeração e na disponibilidade de nutrientes (Forsythe, 1975). Os métodos normalmente utilizados na determinação dos teores de argila, silte e areia baseiam-se na velocidade de sedimentação das partículas que compõem o solo quando suspensas em água após dispersão química e física (Embrapa, 1997). A quantificação das partículas dispersas é

realizada retirando-se alíquota com pipeta, seguida de secagem e pesagem do solo, ou simplesmente por meio da medida da densidade.

De acordo com a textura, o solo pode ser classificado conforme descrito a seguir (EMBRAPA, 2003):

Solos de Textura Arenosa (Solos Leves) - Possuem teores de areia superiores a 70% e o de argila inferior a 15%; são permeáveis, leves, de baixa capacidade de retenção de água e de baixo teor de matéria orgânica. Altamente susceptíveis à erosão, necessitando de cuidados especiais na reposição de matéria orgânica, no preparo do solo e nas práticas conservacionistas. São limitantes ao método de irrigação por sulcos, devido à baixa capacidade de retenção de água o que ocasiona uma alta taxa de infiltração de água no solo e conseqüentemente elevadas perdas por percolação.

Solos de Textura Média (Solos Médios) - São solos que apresentam certo equilíbrio entre os teores de areia, silte e argila. Normalmente, apresentam boa drenagem, boa capacidade de retenção de água e índice médio de erodibilidade. Portanto, não necessitam de cuidados especiais, adequando-se a todos os métodos de irrigação.

Solos de Textura Argilosa (Solos Pesados) - São solos com teores de argila superiores a 35%. Possuem baixa permeabilidade e alta capacidade de retenção de água. Esses solos apresentam maior força de coesão entre as partículas, o que além de dificultar a penetração, facilita a aderência do solo aos implementos, dificultando os trabalhos de mecanização. Embora sejam mais resistentes à erosão, são altamente susceptíveis à compactação, o que merece cuidados especiais no seu preparo, principalmente no que diz respeito ao teor de umidade, no qual o solo deve estar com consistência friável. Apresentam restrições para o uso da irrigação por aspersão quando a velocidade de infiltração básica for muito baixa.

1.4.2 Matéria orgânica do solo (SOM)

A matéria orgânica do solo é um componente essencial relacionado aos processos físicos, químicos e biológicos, fertilidade do solo e produtividade agrícola (Zhao et al., 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Quantificar as enzimas presentes em solos nativos de Cerrado, solos cultivados com a cana-de-açúcar convencional e cultura orgânica e identificar o efeito do manejo na atividade enzimática e nos fatores físico-químicos do solo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a atividade das enzimas fosfatases, β -glicosidase, peroxidase e polifenolxidase em amostras de solo nativo do Cerrado e sob o cultivo de cana-de-açúcar orgânica e convencional;
- Analisar os fatores físico-químicos que influenciam a qualidade de solos em amostras de solo nativo do Cerrado e sob o cultivo de cana-de-açúcar orgânica e convencional;
- Correlacionar os fatores físico-químicos e a atividade das enzimas estudadas;
- Verificar se as enzimas testadas podem atuar como bioindicadores da qualidade de solos do Cerrado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta do solo

As amostras de solo (profundidade 0 – 15 cm) foram coletadas em três diferentes áreas de acordo com o manejo do solo: área com cultivo de cana-de-açúcar convencional (MC), orgânico (MO) e área nativa (SN), sem manejo agrícola, no município de Goiatuba, Goiás. Em cada uma dessas áreas de manejo foram escolhidos três pontos nos quais o solo foi coletado em triplicada, somando um total de nove amostras por área.

As coordenadas geográficas de cada ponto foram anotadas e estão listadas a seguir:

Os pontos na área de cultivo convencional (MC) de cana de açúcar são: MC 1: 18.06806°S e 49.71139°O; MC 2: 18.06383°S e 49.71093°O; MC 3: 18.06384°S e 49.70392°O. Para a área de cultivo orgânico (MO) as coordenadas são MO 1: 18.07656°S e 49.67653°O; MO 2: 18.07394°S e 49.67653°O; MO 3: 18.07455°S e 49.68620°O e para a área de solo nativo (SN), as coordenadas são SN 1: 18.07710°S e 49.67603°O; SN 2: 18.07912°S e 49.68508°O; SN 3: 18.08009°S e 49.68508°O.

Após a coleta, as amostras foram levadas para o laboratório e tamizadas (<2mm-mesh) e armazenadas para as análises posteriores. Todos os resultados foram expressos com base na quantidade de massa seca do solo.

Para quantificar a umidade das amostras, alíquotas de 3g foram pesadas e secas em estufa a 105°C por 48h.

3.2 Estudo bioquímico de enzimas do solo do Cerrado

FOSFOMONOESTERASE

Determinação da atividade enzimática do pH ótimo da fosfomonoesterase

O ensaio enzimático foi realizado de acordo com a metodologia para quantificação de fosfatases descrita por Eivazi e Tabatabai (1977) (44), com modificações, conforme descrito a seguir: foram pesados 16 mg de solo e a eles adicionados 0.4 mL do tampão correspondente a cada pH e 0.1 mL do substrato p-nitrophenil fosfato disódico 2.5 mM. A mistura reagiu por 1h à 55°C em agitação orbital. Em seguida, 0.1 mL de Na₂CO₃ 0.5 M foi adicionado à mistura e a reação foi parada com a adição de 0.4 mL de NaOH 0.1 M. Logo após, a solução foi centrifugada e o sobrenadante lido em espectrofotômetro em comprimento de onda de 400 nm. No controle, foi adicionado o NaOH seguida da adição de Na₂CO₃ imediatamente após a adição do substrato. Uma unidade de enzima foi definido como a quantidade enzima capaz de produzir 1 mg de p-nitrofenol (pNP) após 1h de reação por grama do solo.

A determinação do pH ótimo da fosfomonoesterase, foi feita usando solo nativo do Cerrado. Os tampões utilizados foram, respectivamente: tampão glicina, 0.1 M para o pH 2.0, 3.0 e 4.0, tampão acetato de sódio 0.1 M para os pH 5.0 e 5,5, citrato de sódio 0.1 M pH 6.0, para tampão TRIS 0.1 M para o pH 7.0 e 8.0 e o tampão glicina 0.1 M o pH 9.0 e 10.0 utilizou-se 0.1 M. O perfil de pH foi realizado utilizando o solo nativo do Cerrado.

Após determinação do pH ótimo para a fosfomonoesterase ácida e alcalina, a atividade enzimática foi quantificada nas amostras de solo do manejo orgânico, convencional da cana-de-açúcar e no solo nativo do Cerrado. A fosfomonoesterase

ácida foi quantificada em pH 5.0 em todas as amostras de solos coletadas ou em pH 5.6 no manejo convencional e 5.7 no manejo orgânico para testar a atividade enzimática no pH correspondente ao pH obtido nas diferentes amostras de solo uma vez que o pH pode selecionar diferentes micro-organismos produtores de fosfatase no solo. Já a fosfomonoesterase alcalina foi quantificada no pH ótimo (pH 8.0) conforme resultado obtido a partir do perfil do pH.

β -GLICOSIDASE

Quantificação da atividade enzimática e determinação do pH ótimo da β -glicosidase nos solos com manejo convencional e orgânico da cana-de-açúcar e no solo nativo do Cerrado

A determinação da atividade de β -glicosidases foi realizada segundo metodologia descrita por Eivasi e Tabatabai (1988) (56) com modificações, conforme descrito a seguir: foram pesados 16 mg de solo e a estes, adicionados 0.4 mL de tampão acetato de sódio 0.1 M, pH 5.5 ou tampão fosfato de sódio 0.1 M, pH 7.0. E por fim 0.1 mL do substrato *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo na concentração 0.05 M. A reação procedeu com incubação à 37°C por 1h. Após incubação, adicionou-se 0.1 mL de bicarbonato de sódio 0.5 M e 0.4 mL de NaOH 0.1 M para parar a reação, mistura foi centrifugada e as medidas da atividade do sobrenadante foram feitas em comprimento de onda de 400 nm. A atividade enzimática foi expressa em unidade de enzima (U), expressa em mg de *p*-nitrofenol por grama de solo em uma hora de reação.

Para determinação do pH ótimo da enzima presente nas amostras de solo, foram feitos testes na faixa de pH de 2.0 a 10.0. Os tampões usados foram, respectivamente: tampão citrato de sódio 0.1 M para o pH 2.0 e 3.0, tampão glicina 0.1 M para o pH 4.0;

tampão acetato de sódio 0.1 M para o pH 5.5; tampão fosfato de sódio 0.1 M para os valores de pH entre 6.0 e 8.0, e tampão glicina 0.1 M para os pH 9.0 e 10.0.

Após determinação do pH ótimo para a quantificação da atividade de β -glicosidase nas diferentes amostras, a enzima foi quantificada no solo sob manejo orgânico e convencional da cana-de-açúcar e no solo nativo do Cerrado.

OXIDORREDUTASES

Quantificação da atividade enzimática das oxidorredutases nas diferentes amostras de solo

A atividade de peroxidase foi determinada de acordo com metodologia descrita por Halpin et al., (1989) (72), com modificações, como descrito a seguir: 32 mg de solo foram colocadas para reagir com 0.25 mL de tampão fosfato de sódio 0.1M, pH 6.0, 0.25 mL de peróxido de hidrogênio 0.05 M e 0.5 mL de pirogalol 0.013 M. A mistura reagiu por 1h à temperatura ambiente. Após esse período a mistura foi centrifugada e o sobrenadante lido à 420 nm. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a leitura no espectrofotômetro em 0.1 por hora de reação.

A atividade de polifenoloxidase foi determinada de acordo com Halpin e Lee (1987) (73), com modificações, como descrito a seguir: foram pesados 32 mg de solo e a estes adicionado 1mL de catecol 0.05 M preparado com tampão fosfato de sódio 0.1 M pH 6.0. A mistura reagiu por 1h à temperatura ambiente. Após esse período, a mistura foi centrifugada e o sobrenadante lido em espectrofotômetro usando comprimento de onda 380 nm.

Foram feitos dois controles: em um controle foi utilizando solo e tampão (32 mg de solo + 1 mL de tampão) e o outro tampão e substrato, sendo que neste, para a peroxidase continha 0.25 mL de peróxido de hidrogênio (0.05 M), 0.25 mL de tampão fosfato 0.1 M pH 6.0 e 0.5 mL de pirogalol (0.013 M) e para polifenoloxidase continha 1 mL de catecol 0.05 M.

A atividade enzimática de oxidorredutases foi determinada em unidade de enzima (U) na qual 1U corresponde ao aumento em 0.1 de leitura no espectrofotômetro.

3.3 Análises Estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e os resultados foram processados usando tendência central (média) e dispersão (desvio padrão). Para análise multivariada e testes de correlação o software utilizado foi Statistica 7.0 (StatSoft Inc. Tulsa, OK, USA), assim como o teste de tukey que foi utilizado para determinar as diferenças significantes entre as médias. O nível de significância usado foi 0.05.

A análise de componente principal (ACP) foi realizada para identificar as variáveis que permitem diferir os solos cultivados entre si e do solo nativo de Cerrado e assim observar quais variáveis mais se relacionam com a atividade da β -glicosidase. A APC geralmente revela associações inesperadas entre as variáveis e dessa forma, permite interpretações que não seriam possíveis de outra forma (74). Apenas componentes principais com valores de Eigen que expliquem 10% do total da variância foram consideradas. A rotação Varimax foi realizada para aumentar a interpretação dos componentes não relacionados (75).

Foi realizada ainda uma análise de correlação de Pearson para verificar possíveis correlações entre as variáveis mais relacionadas à atividade de β -glicosidase, a partir das informações obtidas na APC.

4 JUSTIFICATIVA

Goiás tem sido um dos Estados que apresenta grande crescimento de cultivo de cana-de-açúcar que é uma cultura importante para a economia goiana e brasileira, principalmente considerando que os preços do açúcar e do etanol permanecem aquecidos, influenciados principalmente pela quebra de safra no Brasil, que é o principal produtor mundial de açúcar despontando com 55% do total exportado (76).

Apesar da importância econômica da cana-de-açúcar, sabe-se que o plantio de monoculturas gera o empobrecimento do solo devido ao consumo de nutrientes pela cultura e o uso de defensivos agrícolas que se fazem necessários para evitar prejuízos causados por agentes que destroem a plantação. A perda da qualidade do solo, como consequência das técnicas de cultivo agrícola, é reportada por vários autores na literatura (4, 11, 12, 17).

A identificação dos impactos causados pela monocultura da cana-de-açúcar, a detecção precoce da perda de fertilidade do solo e uma remediação dos danos causados são importantes para se evitar a perda da produtividade, uma vez que o empobrecimento e má qualidade do solo podem gerar a chamada quebra de colheita, o que gera prejuízos aos produtores. Não existe, entretanto, nenhum bioindicador efetivo para detecção precoce da perda de fertilidade do solo.

Sabe-se que a alteração dos fatores físico-químicos do solo está relacionada com a perda de qualidade, no entanto, esses fatores não são tão sensíveis, nem respondem com rapidez às alterações ambientais da mesma forma que as alterações biológicas e bioquímicas. De fato, os fatores físico-químicos são os últimos fatores afetados pela perda de fertilidade e dessa forma, quando se detecta alterações físico-químicas, os fatores biológicos já foram drasticamente alterados. Dick e Kandeler (2005) (34)

afirmam que os processos biológicos e bioquímicos do solo são muito importantes para a função do ecossistema terrestre.

A microbiota e as enzimas presentes no solo são os responsáveis por inúmeras reações químicas nesse ambiente além de complementarem suas características físico-químicas. Consequentemente, desempenham um importante papel na qualidade do solo, uma vez que alterações nesses perfis interferem na saúde do solo, esses fatores são excelentes candidatos à bioindicadores da qualidade desse ecossistema.

O solo, contudo, é um ecossistema complexo e ainda pouco compreendido. Fatores como microbiota, insetos, nematoides e inclusive a vegetação, interferem na composição e características deste bioma, e dessa forma, características como pH, textura, presença/ausência de minerais, tornam-se muito específicos em diferentes regiões. Essa particularidade do solo torna necessário o estudo regionalizado desse ecossistema, bem como, o impacto de diferentes culturas. Um elemento importante que permite visualizar essas variações são as enzimas presentes no solo.

Dentre as enzimas mais frequentemente encontradas nos solos estão as fosfatases, β -glicosidases e enzimas do grupo das oxidoredutases. Grande parte das enzimas encontradas no solo está predominantemente na sua forma imobilizada (56, 77, 78), sendo que o solo atua como um suporte natural de enzimas, ao qual podem ser aderidas por adsorção ou ligação covalente (40). De acordo com a literatura (79-82) após a imobilização, algumas características da enzima podem ser alteradas, podendo conferir resistência térmica e à variações no pH.

A equipe de pesquisadores do Laboratório de Química de Proteínas possui experiência nos estudos envolvendo enzimas da classe das hidrolases e oxidoredutases, na forma livre e imobilizada, bem como na avaliação do potencial biotecnológico de plantas do Cerrado e de espécies microbianas deste bioma.

Esse trabalho uniu os conhecimentos e experiências anteriores para o estudo da atividade de enzimas de solos do Cerrado goiano, e para avaliação do impacto causado pelo cultivo intensivo, utilizando como modelo a cana-de-açúcar. Esta experiência será de extrema valia, uma vez que enzimas de solo apresentam-se predominantemente na forma de complexos imobilizadas na matéria orgânica ou inorgânica.

O conhecimento acerca das mudanças da atividade enzimática do solo permitem criar mecanismos para a detecção precoce da perda da fertilidade. Por esta razão, neste estudo são apresentados os resultados sobre o perfil enzimático de solos usado para o cultivo de cana-de-açúcar com manejo orgânico e convencional comparando os resultados obtidos com as características do solo nativo do Cerrado. São apresentados ainda resultados com relação ao impacto do manejo da cana-de-açúcar nos fatores físico-químicos do solo e dos principais fatores que permitem diferenciar o solo nativo dos solos cultivados com cana-de-açúcar sob manejo orgânico e convencional.

A partir desses dados é possível inferir as principais modificações que o manejo da cana-de-açúcar causa nas características químicas e bioquímicas do solo. Dessa forma é possível que novas tecnologias de manejo possam ser desenvolvidas no sentido de reduzir os impactos da agricultura nos solos do Cerrado.

**CAPÍTULO I: ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO JOURNAL OF
AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY**

ARTIGO 1

Effect of Organic and Conventional Management of Sugarcane crop on Soil

Phosphomonoesterases

Purcena, L.L.A.¹, Di-Medeiros, M.C.B.¹, Leandro, W.M.², Fernandes, K.F.¹.

¹ Universidade Federal de Goiás, Departamecnto de Bioquímica e Biologia Molecular, ICB II

² Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia

1 APRESENTAÇÃO

As fosfomonoesterases desempenham um importante papel na qualidade do solo e na nutrição de plantas uma vez que estão envolvidas na mineralização do fósforo e sua consequente absorção pelas plantas. Já foi observado que o manejo do solo causa redução na atividade de fosfomonoesterases tanto por inibir a atividade enzimática, quanto por afetar a produção e liberação dessas enzimas pelos micro-organismos presentes no solo. O tipo de manejo escolhido, tipos de cultura e a região, podem ainda afetar de maneira distinta a atividade dessas enzimas.

Devido ao grande crescimento da cultura de cana-de-açúcar em Goiás é importante avaliar e monitorar os impactos e efeitos dessa monocultura nas características bioquímicas do solo, com destaque no efeito sobre a atividade enzimática.

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos sobre o estudo bioquímico das fosfomonoesterases em solos de Cerrado sob o cultivo de cana-de-açúcar em manejo orgânico e convencional e os resultados obtidos são comparados aos encontrados para o solo nativo do Cerrado. O efeito do manejo foi avaliado tanto na atividade enzimática quanto em fatores físico-químicos do solo. Análises estatísticas foram realizadas para que fosse possível correlacionar os principais fatores físico-químicos relacionados à atividade enzimática e que permitem diferenciar os diferentes solos testados.

**CAPÍTULO II: ARTIGO A SER SUBMETIDO AO JOURNAL OF
AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY**

Study of β -glucosidases and physicochemical factors from Cerrado soil under organic
and conventional management of sugarcane crop

Purcena, L.L.A.^{1,2}, Batista, K.A.¹, Villa Verde, J.² Leandro, W.M.³, Fernandes, K.F.¹.

¹ Universidade Federal de Goiás, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, ICB II

² Universidade Estadual de Goiás, UEG.

³ Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia

Corresponding author: luizaluanna@gmail.com

+5562-35211492

1. APRESENTAÇÃO

O artigo descrito no capítulo I mostrou que o manejo da cana-de-açúcar afetou a atividade da fosfomonoesterase ácida presente no solo. A redução observada na atividade desta enzima foi da ordem de 50%, e que os principais fatores que afetaram a atividade dessa enzima foram a variação do pH, devido à correção pela calagem e a textura do solo.

De modo similar ao ocorrido com as fosfatases, o manejo pode então afetar a atividade de outras enzimas presentes no solo. Dentre essas enzimas, a β -glicosidase apresenta papel relevante na renovação do conteúdo de matéria orgânica e no ciclo do carbono por meio da mineralização desse composto. As β -glicosidases são enzimas abundantes no solo e já foram reportadas como sendo sensíveis a alterações no ambiente do solo sendo considerada candidata a atuar como bioindicador de qualidade.

Nesse sentido, este capítulo apresenta resultados obtidos sobre o estudo de β -glicosidases em solos sob manejo orgânico e convencional da cultura de cana-de-açúcar e esses resultados são comparados com os obtidos para o solo nativo do cerrado. Nesse estudo foi realizada uma análise de componente principal (ACP) para avaliar quais fatores físico-químicos permitem diferenciar o solo nativo dos solos cultivados e que podem afetar a atividade enzimática nesses solos. Foram testados ainda o pH ótimo da enzima no solo nativo do Cerrado e nos solos sob cultivo orgânico e convencional da cana-de-açúcar.

Study of β -glucosidases and physicochemical factors from Cerrado soil under organic
and conventional management of sugarcane crop

Purcena, L.L.A.^{1,2}, Batista, K.A.¹, Villa Verde, J.² Leandro, W.M.³, Fernandes, K.F.¹.

¹ Universidade Federal de Goiás, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, ICB II

² Universidade Estadual de Goiás, UEG.

³ Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos

Corresponding author: luizaluanna@gmail.com

+5562-35211492

Abstract

Sugarcane is an important culture in the current days especially considering the crescent participation of ethanol as biofuel. However, monocultures cause many impacts on soil that must be evaluated in order to guarantee soil quality by early delectation of soil fertility loss. Enzymes play important role in soil because are important in the cycling of C, P and N and is also important for plant nutrition. In this sense, β -glucosidases outstands among soil enzymes because they are important on the crucial step of degradation of cellulose. In this study the impact of organic (OM) and conventional management (CM) of sugarcane culture on β -glucosidases from Cerrado soils were evaluated and the results compared with those obtained for native soil (NS) of Cerrado (Brazilian Savanna). Principal component analysis indicated that characteristics related to pH such as alkali saturation (V%), aluminum saturation (M%), Al^{3+} , soil total acidity (H+Al) and Ca^{2+} are the main factors that permit distinguishing NS from OM and CM. Concerning to pH profile results showed that β -glucosidase presented the same pH profile in NS and OM with optimum pH at the range from 6.0 to 7.0. Moreover, the enzyme activity was very similar, demonstrating that OM presents important characteristics to preserve β -glucosidase activity after soil disturbance. The results indicate that granulometry and CTC are probably the main factors explaining this result since β -glucosidase is immobilized in soil particles and the nature of the support interfere on enzyme activity and stability. At the best conditions of pH, β -glucosidase showed higher activity on NS (133 U) and OM (111 U) followed by CM (82.8 U). The results presented is an important finding especially considering the search for new agriculture practices that reduce the impact on soil quality.

Keywords: β -glucosidases, Cerrado, soil, sugarcane, management

1 Introduction

The increased demand for ethanol has generated interest in the production of sugarcane in many countries. Brazil is the world's largest producer of sugarcane, accounting for one third of the world production. Asian production, which includes India, China and Thailand, accounts for another one third of the world production. India is the world's second largest producer of sugarcane, Thailand is the third and China is the fourth largest (1). In the US, sugarcane is grown commercially in Florida, Louisiana, Texas and Hawaii (2). It shows that sugarcane culture is important not only for Brazilian economy but also for several countries with favorable conditions for this culture.

The high ethanol production is accompanied by increasing on monoculture planting of sugarcane, because it is the main source of this product. However, several authors have reported that monoculture planting causes loss of soil fertility because of the nutrients consumed by plant and the use of pesticides because they change the biomass composition (3-5). Land use also affects activity of many enzymes present in soil (6-9). These biocatalysts in soil are known for their important role in nutrient cycling and plant nutrition. Then, reduction of enzyme activity of soils presents a risk not only for soil quality, but also for agriculture production.

In an attempt to lessen agricultural impacts of monocultures on soil, several managements have been proposed, including Organic management (OM), which is a more environmental friendly alternative and have led to widespread interest in organic farming.

Organic farming is defined as a cultivation system that attempts to produce crops of maximum nutritional quality while respecting the environment and conserving soil fertility. This may be achieved, in part, by means of optimal utilization of local resources and reducing or eliminating altogether the application of synthetic chemicals (10). Some reports have already described the benefits of OM (11, 12) by preserving some biochemical characteristics such as the global, organic and basal carbon (C).

Among the enzymes present in the soil, β -glucosidases stand out among the most important for degradation of soil organic matter. This enzyme acts in a crucial step of cellulose degradation and in the carbon mineralization. They are involved in the production of two molecules of glucose by the hydrolysis of cellobiose and then microorganisms can use glucose as energy source (8).

In this study, the influence of conventional and organic management on β -glucosidase was assessed in cultivated soils from Cerrado (Brazilian Savanna) and the results were compared with those found in the native soil, without any agricultural practices. The main physicochemical characteristics of soils that may affect β -glucosidase activity were also assayed.

2 Materials and Methods

2.1 Materials

p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside was purchased from Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO). All other reagents were analytical grade and were used without further purification unless otherwise specified. Solutions were prepared with distilled deionized water.

2.2 Site description and soil sampling

Soil samples were collected from areas under OM and CM sugarcane crop and NS field in Goiás, Brazil. Samples of up to 15 cm of soil were collected on December 13, 2011. This region is under tropical climate. For the season of November, 2011, the rainfall precipitation was 279.4 mm; in the average, temperature was: minimum 20°C and maximum 30.8°C.

There were three replications per land use type, and each replication was composed of three soil sample cores. The geographical coordinates for CM replications were: CM 1: 18.06806°S and 49.71139°W; CM 2: 18.06383°S and 49.71093°W; CM 3: 18.06384°S and 49.70392°W; for OM, the coordinates were OM 1: 18.07656°S and 49.67653°W; OM 2: 18.07394°S and 49.67653°W; OM 3: 18.07455°S and 49.68620°W. The coordinates for NS were NS 1: 18.07710°S and 49.67603°W; NS 2: 18.07912°S and 49.68508°W; NS 3: 18.08009°S and 49.68508°W.

Fresh samples were sieved (<2 mm) after removing debris and stored at -8 °C for β -glucosidase assay. In order to standardize the amount of soil weighted in each test, moisture was determined from weight loss after drying the samples at 105°C for 48 h.

The area under OM has been treated with this management for 10 years. The cultivated area was fertigated with vinasse (average of 436 m³/ha per year) and received 29.1 ton/ha of an organic compound which includes sugarcane bagasse and filter cake.

The area under CM has been treated with this management for more than 10 years. This area was fertigated with vinasse (average 306 m³/ha per year) and this area was also treated with commercial pesticides and fertilizers. In the last three years, the chemical compounds used in CM were ammonium nitrate, ammonium phosphate, (RS)-5-amino-1-(2,6-dichloro- α,α,α -trifluoro-p-tolyl)-4-trifluoromethylsulfinylpyrazole-3-carbonitrile, 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea, 3-cyclohexyl-6-dimethylamino-1-methyl-1,3,5-triazine-2,4(1H,3H), 2',4'-dichloro-5-(4-difluoromethyl-4,5-dihydro-3-methyl-5-oxo-1H-1,2,4-triazol-1-yl) methanesulfonamide, limestone, gypsum and a herbicide of the organoarsenic family.

The area under NS is a preserved Cerrado area in the sugarcane mill property, presenting the features of the vegetation of this biome, and has not been explored for any agriculture or livestock.

All the managements in the study area were under rotation with *Crotalaria juncea* every 5 years.

2.3 Physicochemical analyses

Physicochemical analyses were performed at the Laboratory of Soil Analysis of the School of Agronomy at Universidade Federal de Goiás according to methodology described by EMBRAPA (13).

The analyses included the soil granulometry (percentage of clay, silt and sand) and content of soil organic matter (SOM). pH using CaCl₂ was determined by

potenciometer. Saturation of acids (m%), saturation of alkalis (V%) and the potential acidity total ($H^+ + Al^{+3}$ cmol_c/dm³) were determined by Schoemaker, McLean & Pratt buffer (SMP) (14). Aluminum (Al^{+3} cmol_c/dm³) was extracted with KCl 1 mol/L and determined by volumetric titration. Inorganic phosphorus (P^+ cmol_c/dm³) and Potassium (K^+ cmol_c/dm³) were extracted by Mehlich 1 and determined by colorimetry and flame photometry, respectively. Magnesium (Mg^{+2} cmol_c/dm³) and calcium (Ca^{+2} cmol_c/dm³) were extracted with KCl 1 mol/L and determined by atomic absorption spectrophotometry. Cation exchangeable capacity (CEC), Ca/K, Ca/Mg, Mg/K, Ca/CEC, K/CEC and Mg/CEC were also determined.

2.4 Optimum pH and enzyme assay

In order to determine the optimum pH for the measurement of enzyme activity, the reaction was performed at pH 2.0, 3.0 (0.1 M citrate buffer), pH 4.0 (0.1 M glycine buffer), pH 5.5 (0.1 M acetate buffer), pH 6.0 and 7.0 (0.1 M sodium phosphate buffer) and 8.0 (0.1 M TRIS buffer), using samples collected from NS, OM and CM.

The assays were performed following the methodology described by Eivazi & Tabatabai (12) with modifications as following. The reactions were conducted using 16 mg of soil (dry basis), 0.4 mL of the proper buffer and 0.1 mL of 5 mM *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside. The mixture reacted at 37° C for 1h. Then, 0.1 mL of 0.5 M Na₂CO₃ was added followed by the addition of 0.4 mL of 0.1 M NaOH to stop the reaction. The mixture was centrifuged and the readings of the supernatant were done at 400 nm. A control was performed by adding NaOH followed by Na₂CO₃ to stop the reaction immediately after the substrate adding. One enzyme unit (U) was defined as the

amount of enzyme per gram of soil that released 1 mg of p-nitrophenol after 1 h reaction.

2.5 Statistical Analyses

All experiments were conducted in triplicate with repetitions, and the results were processed by central tendency (mean) and dispersion (standard deviation) measurements. Statistica software 7.0 (StatSoft Inc. Tulsa, OK, USA) was used to perform multivariate analysis (ANOVA) followed by correlation, as well as Tukey's test to determine the significant differences among the means. The level of significance p used was 0.05.

Principal component analysis (PCA) was performed to evaluate the variables that would interfere on β -glucosidase activity according to soil management. PCA often reveals previously unexpected associations among variables and thereby allows interpretation that would not be possible otherwise (13). Only principal components with Eigen values that explain at least 10% of the total variance were retained.

3 Results and Discussion

3.1 Principal Component Analyses

Evaluating the soil quality it is common to consider the physicochemical, biological and biochemical factors isolated from each other. However, considering the complexity of soil ecosystem, it is not possible to separate these factors and their inter-relationships on soil function. Therefore, it must be also considered and understood how the interactions among physicochemical, biochemical and biological factors occur in the

different soils type, contributing to a better knowledge about soil quality and preservation.

In this sense, principal component analyses (PCA) was carried to evaluate and identify the relationship among the physicochemical factors and the enzyme activity. This approach allows separating the variables in groups of similarity, which contribute to differentiate NS and the cultivated soils.

Table 1 shows the scores of principal components 1 and 2 for the studied variables. Factor 1 explained 50.4% of the total variance and the variables that contributed to this axis and are defined by factor 1 are pH, Ca^{2+} , Mg^{2+} , H+Al, Al^{3+} , CEC, M%, V%, Ca/Mg, Ca/Mg, Ca/K and Ca/CEC. Factor 2 explained 22.4% of the total of variance and the variables contributing to this axis are β -glucosidase activity, silt% and K/CEC. Variables explained by the same PC similarly affect the management, which they describe.

According to Table 1, PC 1 presents the highest score. It means that it presents positive and higher scores than the average for H+Al, extractable Al^{3+} , and M%. PC 2 presents positive and higher scores for β -glucosidase activity, sand % and K/CTC%.

Figure 1 presents the scores of the variables tested according to PC (1A) and the scores of the samples collected from OM, CM and NS according to the PC. In the Figure 1A, it is observed the formation of three variables grouping. The loadings of the three tested soils with respect to PC 1 and PC 2 were also evaluated and are shown in Table 1B.

Figures 1A and 1B show that the variables that permit to distinguish NS from the cultivated soils are extractable Al^{3+} , H+Al, M%, sand%, β -glucosidase activity and K/CEC%. The variables that permit distinguish OM from CM and NS are Mg^{2+} (cmolc/dm^3), pH, Ca^{2+} (cmolc/dm^3), CEC%, V%, Ca/Mg, Ca/K and Ca/CEC%. Finally,

the main variable that distinguish CM from both OM and NS is the silt content (Figure 1A and 1B).

Based on this information, granulometry and pH are the most important variable differing the tested soils and that may present significant interference on β -glucosidase activity. In this sense, tests were conducted to better understand the effect and the relationship of these variables on β -glucosidase activity.

3.2 Effect of pH on the activity of β -glucosidase of soils from Cerrado

Figure 2 presents the results of the pH profile for samples from OM, CM and NS.

The results show that for NS, there are two ranges of high β -glucosidase activity according to pH. The first range corresponds to pH 3.0 (49 U) to 4.0 (45 U) and the second from pH 6.0 (98 U) to 7.0 (133 U). OM presents the same pH profile that NS with two ranges of high enzyme activity, one peak at pH 4.0 (46 U) and another at range from pH 6.0 (111 U) to 7.0 (100 U). CM, however, presents a pH profile displaced to the acid range with a peak of high β -glucosidase activity at pH 3.0 (39 U) and other at pH 5.5 (82.8 U). This last peak slowly decreases, presenting a plateau between pH 6.0 and 7.0 with 38 U and 42.4 U, respectively.

The pH profile showed in Figure 2 suggests the presence of different isophorms of β -glucosidase in Cerrados soils which is an expected result considering the biodiversity of the Cerrado biome. Several authors have already reported the production of different isoforms of β -glucosidase by different fungi present in soil (15-19).

OM and NS presented a very similar pH profile with the same optimum pH for β -glucosidase activity, which differed from CM profile. Some considerations can be

inferred from this result. One consideration is that this difference on the pH profile is, possibly, consequence of changes in the microbial community of the soil and then, the different microbial community produce and release different amounts and isoforms of β -glucosidases on soil, which may be a consequence of the sugarcane management. Additionally, the fact that OM presented a very slight decrease in β -glucosidase activity compared to NS is an indicative that this management slightly interfere in the microbial community

Many studies have already reported the advantages of OM to conserve soil characteristics. Other authors (20-22) reported that higher microbial biomass content, higher organic carbon and SOM content was observed in OM. Garcia-Ruíz et al., (2009) (23) obtained similar results, researching the effect of CM and OM on soils under olive agriculture. Moscatelli et al., (2012) (24), studying β -glucosidase as bioindicators of soil quality observed that peas, wheat and tomato crops under OM presented higher enzymatic activity than the soil under CM of these cultures. Other studies also support our results and report a reduction on β -glucosidase activity on CM. Masciandaro and Ceccanti, (1999) (22), identified the reduction on activity of several soil enzymes in intensive agriculture of cereals when compared to NS.

The higher activity of β -glucosidase in OM than in CM may be related to the higher amount of vegetal residues present on soil under this management. Masciandaro and Ceccanti, (1999) (22), observed that soils in which vegetal residues were left covering soil for a month after harvesting, presented higher β -glucosidase activity than soils under intensive wheat agriculture.

In the present study, the higher activity of β -glucosidase in OM than in CM might be a consequence of the sugarcane straw after harvesting, which is a common practice used to increase SOM and also because of the organic fertilization using

vinasse and filter cake in OM. In OM, there was a higher amount and more frequent addition of vinasse and filter cake than CM. In two years 572 m³/ha of vinasse were applied on sugarcane crop under OM, while 306 m³/ha were applied in CM. Moreover, the sugarcane crop under OM received 2.2 ton/ha more of organic compound constituted of filter cake and sugarcane bagasse than the soil under CM.

Therefore, it is possible to conclude that sugarcane under OM presents more advantages concerning to soil quality when considering β -glucosidase activity, which is a very important enzyme for the degradation of cellulosic residues and in the carbon availability. In this sense, the measurement of the activity of β -glucosidase is a strong candidate to evaluate changes that may affect soil quality.

The pH profile of β -glucosidase in NS, OM and CM is an interesting finding of this study. Even though there was a difference between the optimum pH for β -glucosidase catalysis and the soil pH, the enzyme maintained its activity. The maintenance of β -glucosidase activity in unfavorable pH is possibly because they are immobilized on soil particles. It is known that the chemical characteristic of a support in which an enzyme is immobilized, may interfere on the microenvironment of catalysis (25-27).

The immobilization of enzymes on soil particles leads us to the other consideration about the pH profile showed in Figure 2 and it regards to the results presented in Figure 1 (PCA analyses) and in the Tables 2 and 3. According to Table 2 and 3, OM and NS present similarity in the clay (OM 34 and NS 35%) and silt (OM 16 and NS 17%) content and in the CEC (OM 3.4 and NS 3.3 cmol_c/dm³). CEC is the cationic exchange capacity and is related to the ability of soil to exchange basic cations that will then be available for plant absorption and will not be leached. If the soil presents high CEC, which is the case of CM (4.6 cmol_c/dm³), it means that the soil particles have

more positive charges adsorbed on it. Consequently, the H^+ ions added by the buffer at an acid range will be repelled and the enzyme microenvironment will remain more basic causing the apparent displacement of the optimum pH in direction to the acid range observed in CM. This partition effect has been reported by several authors as consequence of enzyme immobilization dependent of the support characteristics (25, 28, 29). In this sense, when studying enzymes from soils it must be considered that most of these biocatalysts are immobilized on soil particles and the nature of the support will affect the enzyme behavior.

The optimum pH for β -glucosidases from Cerrado soils did not differ from most of the results reported in the literature. Most methodologies for quantification of soil β -glucosidase activity report optimum pH ranging around 6.0 to 6.5. Masciandaro and Ceccanti, (1999) (22) studying soil samples collected from Spain and Italy, measured β -glucosidase in pH 6.5; Eivaizi and Tabatabai, (1988) (8) studying different soil samples collected from different states in USA, carried the enzyme reaction at pH 6.0; Yan et al., 2010 observed optimum enzyme activity of β -glucosidase immobilized on soil colloids at the pH range from 5.0 to 6.0.

The results about the pH profile of β -glucosidase from NS, OM and CM may contribute to the development of new technologies of management. For instance, sugarcane is not continuously cultivated and during the time it is not been cultivated there is a rotation crop with another plant culture (commonly *Crotalaria juncea*). Then, during this period, the soil pH could be altered near to the optimum pH for β -glucosidase activity, which would increase the biomass and/or the synthesis and releasing of this enzyme on soil.

Another approach could be the immobilization of β -glucosidase on a support that change its state of ionization according to soil pH and this way maintain the enzyme

microenvironment pH close to its optimum. This approach could then enhance the enzyme activity minimizing the pH effect caused by the management.

3.3 Granulometry of Cerrado soil and β -glucosidase activity

Granulometry of soil is another variable that differentiated the tested soils and may also affect β -glucosidase activity. According to the PCA the relationship between NS and OM was demonstrated by PC 2 and explained 22% of the total variance of the results. This result presents the heterogeneity of the soil with respect to granulometry and may be a consequence of the sugarcane management.

In fact, the Pearson correlation analysis showed that there was a positive correlation between β -glucosidase activity and sand content ($r=0,45$; $p<0,05$), and a negative correlation between β -glucosidase activity and silt content ($r=-0,45$; $p<0,05$). This result demonstrated that the granulometry of soil, especially considering silt and sand content, interfere on β -glucosidase activity.

There have been rising interest on immobilization of enzymes on soil and research about soil biochemistry and many studies have been carried aiming to identify and understand the interactions between enzymes and soil organic and mineral particles and also how these interactions change enzyme behavior and activity.

Yan et al., (2010) (30), demonstrated that β -glucosidase activity presented higher adsorption and lower desorption when immobilized on thinner soil particles. Figures 1A and 1B, however, clearly show that in the case of Cerrado soils, it is necessary an adequate proportion among sand, silt and clay content to maintain the enzyme activity. Sand content found in Cerrado soils is high, nevertheless, only this information is not

enough to classify Cerrado as a low fertile soil. Other factor must be considered to a more conclusive affirmation.

Some studies about enzyme immobilization process and the importance of granulometry on preserving enzyme activity have been carried. Sarkar et al., (1989) (31), researched the influence of different soil particles and their proportion to the activity of different enzymes activity, among them β -glucosidase. They observed that β -glucosidase presented higher retention of activity when immobilized on kaolinite, in soil with higher sand content and in soil with high silt content respectively. They also observed that there was a reduction on β -glucosidase activity with the increase of clay in relation to sand.

Lammirato et al., (2010) (32), studied the immobilization of β -glucosidase in different soil particles and concluded that kaolinite presented the higher adsorption of this enzyme followed by goethite and montmorillonite. The authors described that the main factor influencing the adsorption of β -glucosidase to the support was not the size of the superficial area but the electric properties of the mineral surface (Figure 3).

There are still many questions about the immobilization of enzymes on soil. It is known that enzymes present distinct behaviors according to the support where they are immobilized on. Laccases presented higher retention of activity when adsorbed in bentonite and lower activity retention when adsorbed on clay. In addition, the increase on clay content in relation to sand increased enzyme activity retention of immobilized laccase (31).

Considering that Cerrado soil has kaolinite in great part of its composition, the results obtained in this study are in accordance with the results reported by Lammirato et al., (2010) (32), since Cerrado soils present adequate conditions to β -glucosidase immobilization (CEC and granulometry) and, consequently, to the increase on its

stability to unfavorable environmental conditions. It explains the higher enzyme activity on Cerrado soils than those reported on literature, since the enzyme immobilization is closely related to the preservation of the tridimensional structure of the enzyme.

In spite of the higher sand content, aluminum toxicity and low CEC of Cerrado soils, it is observed that the β -glucosidase measurements is much higher than the described on literature. Badiane et al 2001, studying the influence of different soil cover on enzyme activities in soils from Senegal (African Savannah) obtained β -glucosidase activities ranging from 37 to 78 U g⁻¹, Bandick e Dick 1999, studying soils from Oregon, USA under different cultures managements (cerals, legumes and grass) observed β -glucosidase activity ranging from 58 to 80.7 U g⁻¹. Then, it is important to point out that Cerrado soil presents great potential as support for enzyme immobilization and in contrast to what is disseminated, may be a fertile soil with specific conditions that permit the maintenance of the activity of essential biocatalysts for nutrients availability on soil.

Considering the soil quality, not only physicochemical factors such as CEC and SOM content must be considered. The biochemical conditions of the soil, including enzyme activities, must then be evaluated, since they are related with the soil functions (7).

Sugarcane under OM and CM distinctly affected β -glucosidase activity. There was a slight reduction of β -glucosidase in the soil under OM and it presented the same pH profile that NS. This result shows that OM probably better preserves NS characteristics from the biochemical point of view that allow the maintenance of the enzyme activity. In fact, CEC and granulometry of NS and OM are similar and considering that these parameters are closely related to the nature of particles where

enzyme is immobilized on soil, than a similar behavior was expected for β -glucosidase activity.

It is also important to consider that usually, the physicochemical characteristics are the main factors considered on agriculture to evaluate soil quality and the corrections requested. In addition, when the physicochemical factors are affected, biological and biochemical parameters have already been drastically affected. In this sense, the knowledge and understanding about the characteristics of the enzymes and how they act in each soil type and in different agriculture management is very important, especially considering the possibility of developing a sustainable management and bioremediation methods.

Acknowledgements

L.L.A.P thanks FAPEGO for fellowship and financial support.

References

1. FAS Foreign Agricultural Service. <http://www.fas.usda.gov/> (18/02/2014),
2. NASS, N. A. S. S. Crop Production Annual Summary. <http://www.nass.usda.gov/> (18/02/2014),
3. Klink, C. A., Machado, R.B. , Conservation of the Brazilian Cerrado. *Conservation Biology* **2005**, *19*, 707 - 713.
4. Ritz, K., Black, H.I.J., Campbell, C.D., Harris, J.A, Claire W., Selecting biological indicators for monitoring soils: A framework for balancing scientific and technical opinion to assist policy development. *Ecological Indicators* **2009**, *9*, 1212-1213.
5. Martinez, C., Hancock, G.R., Kalma, J.D. , Relationships between 137Cs and soil organic carbon (SOC) in cultivated and never-cultivated soils: An Australian example. *Geoderma* **2010**, *158*, 137 - 147.
6. Ndour Ndèye Yacine Badiane, J. L. C., E. Patea, D. Masse , C. Rouland, Use of soil enzyme activities to monitor soil quality in natural and improved fallows in semi-arid tropical regions. *Applied Soil Ecology* **2001**, *18*, 229–238.
7. Dick, R. P., Kandeler, E., Enzymes In Soils. In *Encyclopedia of Soils in the Environment*, Hillel, D., Ed. Oxford, 2005; pp 448 - 455.
8. Eivazi, F., Tabatabai, M.A., Glucosidases and Galactosidases in Soils. *Soil Biology & Biochemistry* **1988**, *20*, 601-606.
9. K.Wei, Z. H. C., X.P. Zhang,W.J. Liang, L.J. Chen, Tillage effects on phosphorus composition and phosphatase activities in soil aggregates. *Geoderma* **2014**, *217–218*, 37–44.
10. Roberto García-Ruiz, V. O., M. Belén Hinojosa, Jose Antonio Carreira, Suitability of enzyme activities for the monitoring of soil quality improvement in organic agricultural systems. *Soil Biology & Biochemistry* **2008**, *40*, 2137–2145.
11. Snapp, S. S., Gentry, L.E., Harwood, R., Management intensity – not biodiversity – the driver of ecosystem services in a long-term row crop experiment. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **2010**, *158*, 242-248.
12. Mazzoncini, M., Canali, S., Giovannetti, M., Castagnolli, M., Tittarelli, F., Antichi, D., Nannelli, R., Cristani, C., P. Bàrberi, Comparison of organic and conventional stockless arable systems: A multidisciplinary approach to soil quality evaluation. *Applied Soil Ecology* **2010**, *44*, 124 - 134.
13. EMBRAPA, *Sistema brasileiro de classificação de solos* 2a ed.; Serviço de Produção de Informação: Brasília, DF, 1999; p 306.
14. Shoemaker, H. E. M., E.O.; Pratt, P.F., Buffer methods ofr determining lime requirements of soils with appreciable amounts of extractable aluminum *Soil Science Society* **1961**, *25*, 274-277.
15. Rajasree KP , M. G., Pandey A, Sukumaran RK, Highly glucose tolerant β -glucosidase from *Aspergillus unguis*: NII 08123 for enhanced hydrolysis of biomass. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **2013**, *40*, 967-975.
16. Sonia, K. G., Chadha, B.S., Badhan, A.K., Saini, H.S., Bhat, M.K. , Identification of glucose tolerant acid active b-glucosidases from thermophilic and thermotolerant fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2008**, *24*, 599–604.
17. Aires, R. S., Steindorf, A.S., Ramada, M.H.S., Siqueira, S.J.L., Ulhoa, C.J., Biochemical characterization of a 27 kDa 1,3-b-glucanase from *Trichoderma asperellum* induced by cell wall of *Rhizoctonia solani*. *Carbohydrate Polymers* **2012**, *87*, 1219–1223.
18. Bara, M. T. F., Lima, A.L., Ulhoa, C.J. , Purification and characterization of an exo-L-1,3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. *FEMS Microbiology Letters* **2003**, *219*, 81-85.
19. Singhanian, R. R., Pate, A.K.I., Sukumaran, R.K., Larroche, C., Pandey, A. , Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology* **2013**, *127*, 500–507.

20. Ngosonga, C., Jaroschb, M., Rauppb, J., Neumannc, E., Ruessa, L., The impact off arming practice on soil microorganisms and arbuscular mycorrhizal fungi: Crop type versus long-term mineral and organic fertilization. *Applied SoilEcology* **2010**, *46*, 134–142.
21. Per Schjønning, S. E., Lars J. Munkholm, Kasia Deboz, Soil quality aspects of humid sandy loams as influenced by organic and conventional long-term management. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **2002**, *88*, 195–214.
22. Masciandaro, G., Ceccanti, B. , Assessing soil quality in different agro-ecosystems through biochemical and chemico-structural properties of humic substances *Soil & Tillage Research* **1999**, *51*, 129-137.
23. García-Ruíz, R., Ochoa, V., Vinegla, B., Hinojosa, M.B. , Pena-Santiago, R. , Liébanas, G. , Linares, J.C., Carreira, J.A. , Soil enzymes, nematode community and selected physico-chemical properties as soil quality indicators in organic and conventional olive oil farming: Influence of seasonality and site features *Applied Soil Ecology* **2009**, *41*, 305–314.
24. Moscatelli, M. C., Lagomarsino, A., Garzillo, A.M.V., Pignataro, A., Grego, S. , Beta-glucosidase kinetic parameters as indicators of soil quality under conventional and organic cropping systems applying two analytical approaches. *Ecological Indicators* **2012**, *13*, 322–327.
25. L.L.A. Purcena, S. S. C., S. Mitidieri, K.F. Fernandes, The immobilization of trypsin onto polyaniline for protein digestion. *Materials Science and Engineering C* **2009**, *29*, 1077–1081.
26. Bissett, F., Sternberg, D. , Immobilization of Aspergillus Beta-Glucosidase on Chitosan. *Applied and Environmental Microbiology* **1978**, *35*, 750-755.
27. González-Sáiz, J. M., Pizarro, C. , Polyacrylamide gels as support for enzyme immobilization by entrapment. Efect of polyelectrolyte carrier, pH and temperature on enzyme action and kinetics parameters. *European Polymer Journal* **2001**, *37*, 435-444.
28. Fernandes, K. F., Lima, C.S., Lopes, F.M., Collins, C.H., Properties of horseradish peroxidase immobilised onto polyaniline. *Process Biochemistry* **2004**, *39*, 957-962.
29. Fernandes, K. F., Lima, C.S., Pinho, H, Collins, C.H., Immobilization of horseradish peroxidase onto polyaniline polymers. *Process Biochemistry* **2003**, *38*, 1379-1384.
30. Yan, J., Pan, G., Ding, C., Quan, G., Kinetic and thermodynamic parameters of b-glucosidase immobilized on various colloidal particles from a paddy soil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2010**, *79*, 298-303.
31. Sarkar, J. M., Leonovicz, A., Immobilization of Enzymes on Clays and Soils. *Soil Biology & Biochemistry* **1989**, *21*, 223-230.
32. Lammirato, C., Miltner, A., Wick, L.Y. , Kästner, M., Hydrolysis of cellobiose by b-glucosidase in the presence of soil minerals e Interactions at solideliquid interfaces and effects on enzyme activity levels. *Soil Biology & Biochemistry* **2010**, *42*, 2203-2210.

Figure captions

Figure 1: A) Relationship between CP1 *versus* CP2 considering the scores for each físico-chemical variables and for β -glucosidase. B) Relationship between CP1 *versus* CP 2 considering the scores for the soil samples from each management and native soil. ● native soil, ◆ organic management and ■ conventional management.

Figure 2: pH profile of β -glucosidase from Native Soil (●), Conventional Mangement (▲) and Organic Management (■) of sugarcane crop.

Figure 3: Conceptual model of interaction between β -glicosidase-soil surface: the high density of charges of montmorilonite strongly avoid the adsorption; the lower charge density in kaolinite is more favorable for the enzyme adsorption; the positive charges of goethite are compensated by the presence of phosphate ions and adsorption mechanisms are similar to kaolinite mechanism.

Tables

Tabela 1: Principal component loadings after Varimax rotation. The soil parameters are grouped according to the maximum fittings to principal components (Correlation coefficients >0.50; n=21)

Variable	Principal Component	
	PC 1 (50.4%)	PC 2 (22.4%)
β -glucosidase	0.62	0.71
Clay	0.38	-0.67
Silt	0.27	-0.77
Sand	-0.37	0.86
SOM	0.04	0.29
pH	-0.90	-0.38
Extractable P	-0.50	0.44
Extractable K	-0.65	0.66
Extractable Ca	-0.95	0.001
Extractable Mg	-0.86	0.27
H+Al	0.92	0.13
Extractable Al	0.83	0.10

CEC	-0.90	0.21
M	0.84	0.11
V	-0.98	-0.05
Ca/Mg	-0.71	-0.30
Mg/K	-0.41	-0.54
Ca/K	-0.75	-0.57
Ca/CEC	-0.96	-0.16
Mg/CEC	-0.67	0.20
K/CEC	-0.22	0.77

a Only principal components with eigen values > 1 and those explaining > 10% of the total variance were retained.

b Correlations with absolute values higher than 0.50 are in bold.

Table 2: Amount of clay, silt, sand, SOM and pH in the cropped and native soils

	Management		Native soil
	Conventional	Organic	
Clay %	39 ^a ±1.4	34 ^b ±2.8	35 ^{a,b} ±2.8
Silt %	25 ^a ±0.9	16 ^b ±1.4	17 ^b ±1.1
Sand %	37 ^b ±1.2	54 ^a ±1.1	44 ^b ±7.6
SOM %	2.9 ^a ±0.5	2.9 ^a ±0.6	3.0 ^a ±0.5
pH	5.6 ^a ±0.1	5.7 ^a ±0.2	4.9 ^b ±0.1

Results are means \pm standard deviation of three determinations. Data followed by the same characters in the same line are not significantly different ($p > 0.05$).

Table 3: Values of ions and alkali saturation (V%) on cropped and native soils

	Management		Native soil
	Conventional	Organic	
extractable P ($\text{cmol}_c/\text{dm}^3$)	1.2×10^{-3b} ± 0.0005	11.3×10^{-3a} ± 0.008	2×10^{-3b} ± 0.0007
extractable K ($\text{cmol}_c/\text{dm}^3$)	$0.13^b \pm 0.02$	$0.25^a \pm 0.02$	$0.17^b \pm 0.05$
extractable Ca ($\text{cmol}_c/\text{dm}^3$)	$1.5^b \pm 0.3$	$2.6^a \pm 0.4$	$0.5^c \pm 0.2$
extractable Mg ($\text{cmol}_c/\text{dm}^3$)	$0.4^a \pm 0.1$	$0.6^a \pm 0.1$	$0.5^a \pm 0.2$
V %	$54^a \pm 8.2$	$71^a \pm 9.2$	$35^b \pm 10.2$
CEC ($\text{cmol}_c/\text{dm}^3$)	$4.6^a \pm 0.3$	$3.4^b \pm 0.7$	$3.3^b \pm 0.5$

Results are means \pm standard deviation of three determinations. Data followed by the same characters in the same line are not significantly different ($p > 0.05$).

Figure graphics

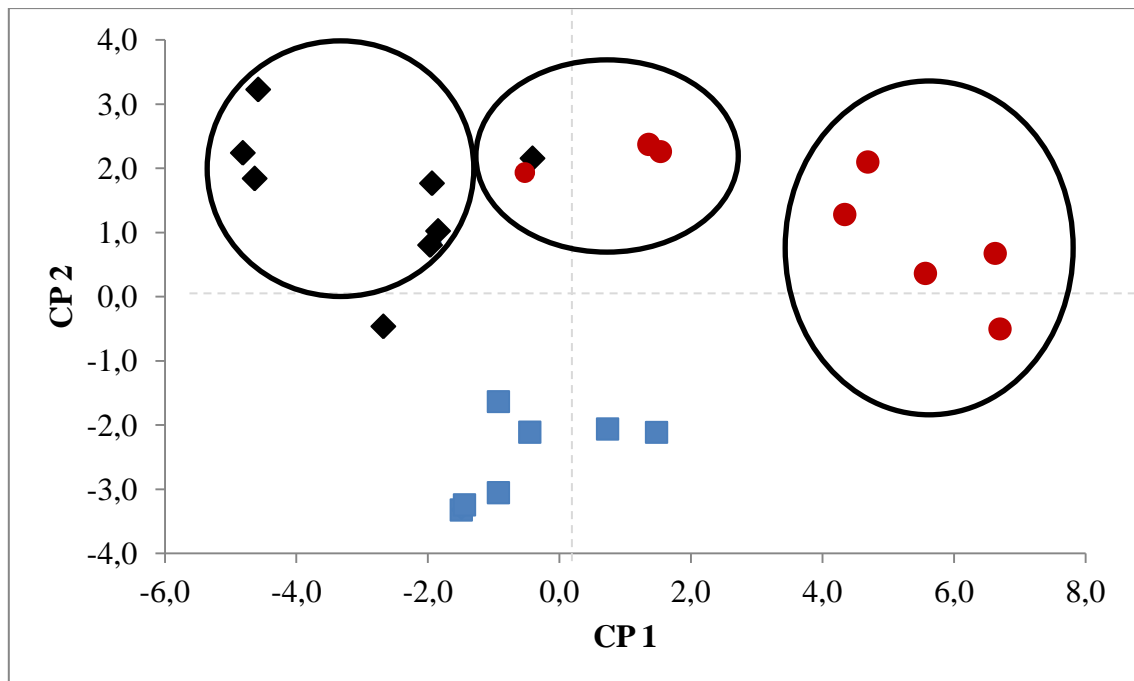
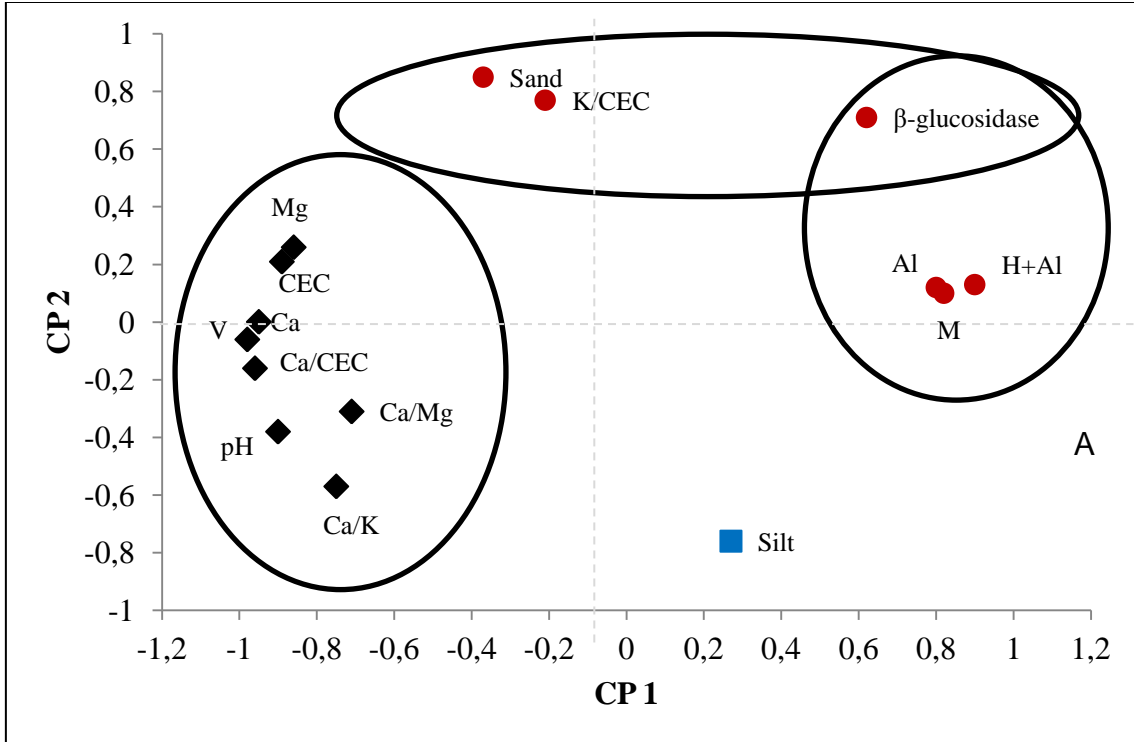


Figure 1:

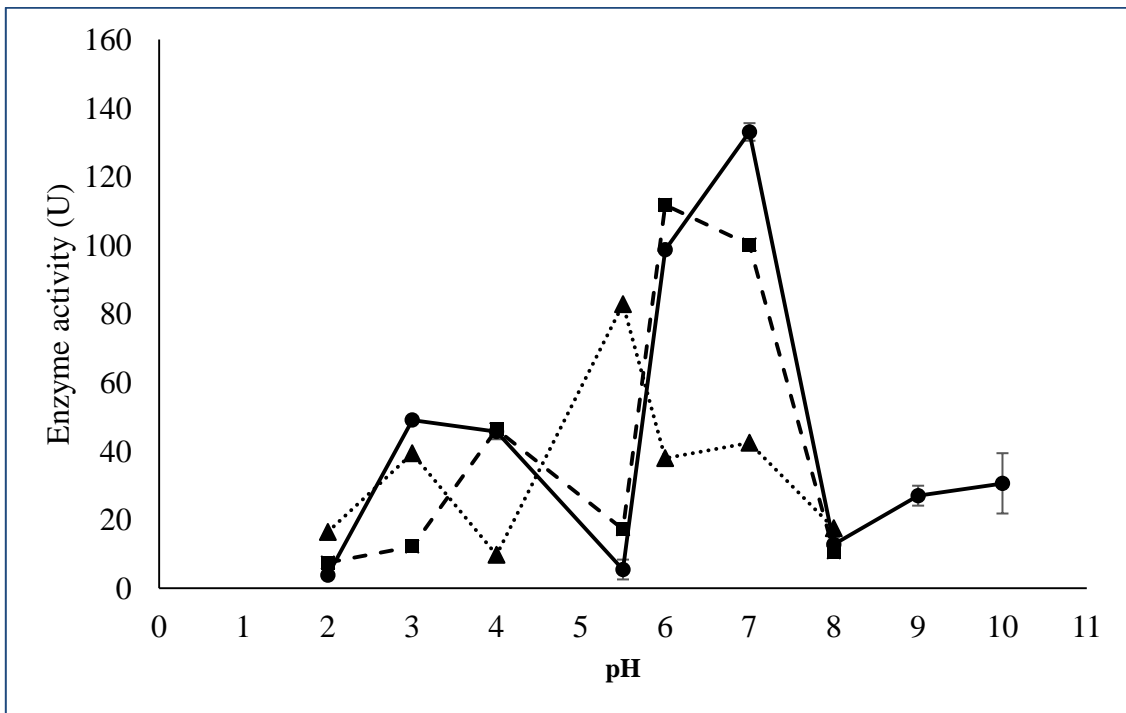


Figure 2:

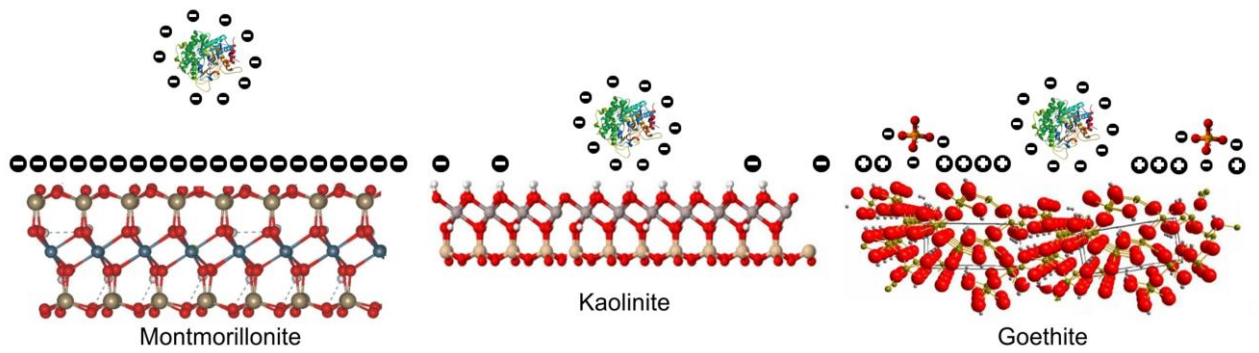
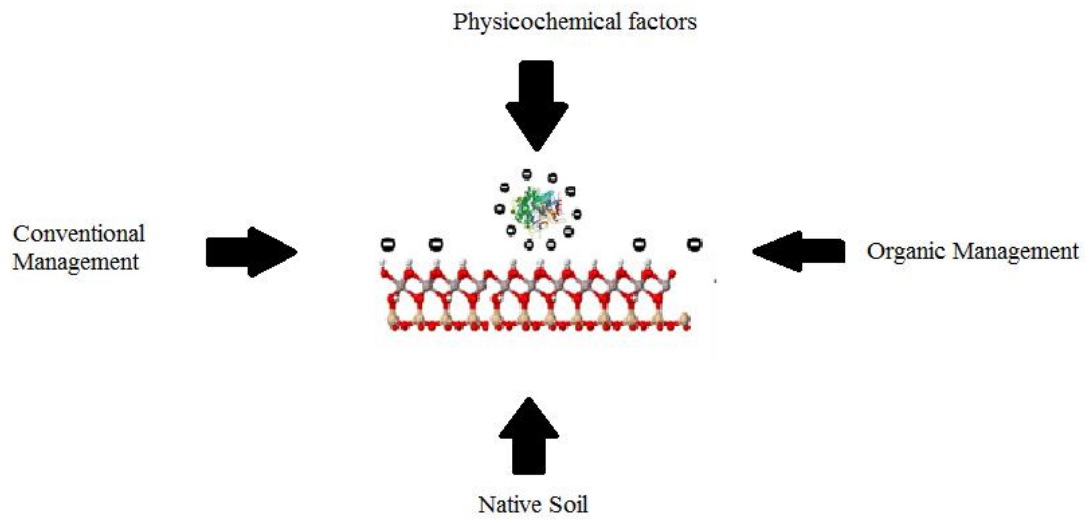


Figure 3:

TOC GRAPHIC



**CAPÍTULO III: EFEITO DO MANEJO ORGÂNICO E CONVENCIONAL DA
CANA DE AÇÚCAR EM ENZIMAS OXIDATIVAS DO SOLO DO CERRADO**

1 APRESENTAÇÃO

Os resultados apresentados nos capítulos anteriores mostraram o efeito do manejo orgânico e convencional da cana de açúcar sobre hidrolases do solo do Cerrado. Foi observada a redução na atividade dessas enzimas quando comparada com a atividade enzimática no solo nativo como consequência do manejo, com destaque para as alterações no pH do solo. Os resultados também mostraram que o pH é um fator importante que deve ser considerado no estudo de enzimas do solo. Para a fosfomonoesterase a atividade enzimática foi maior no solo nativo e não houve diferença estatística na atividade da enzima nos solos cultivados. Para β -glicosidases, a atividade enzimática também foi maior no solo nativo, mas para esta enzima o manejo orgânico apresentou atividade enzimática maior que o manejo convencional.

As enzimas oxidativas são importantes na transformação da matéria orgânica do solo, que é um fator que contribui para a qualidade deste solo. Além disso, também podem atuar como biorremediadoras naturais degradando compostos encontrados em defensivos agrícolas. As oxidorreduções atuam ainda no potencial redox dos solos o que influencia nas características desse ecossistema, como por exemplo a capacidade de troca catiônica. No entanto, muito pouco ainda se tem estudado sobre o efeito do manejo de culturas sobre essas enzimas, especialmente em solos do Cerrado.

Dessa forma, a atividade de polifenoloxidasas e peroxidases foi também avaliada nos solos sob os manejos convencional e orgânico da cana de açúcar. Da mesma forma, esses resultados foram comparados para aqueles encontrados no solo nativo.

Os resultados obtidos neste estudo serão utilizados para compor um artigo a ser submetido para publicação.

2 INTRODUÇÃO

A despolimerização da matéria orgânica do solo realizada por catálise enzimática produz compostos orgânicos solúveis e com baixo peso molecular. Esta fração da matéria orgânica do solo é a fonte imediata de energia, carbono, entre outros nutrientes importantes para as vias metabólicas dos micro-organismos, além de desempenhar importantes papéis nos processos envolvidos na qualidade do solo (14).

Os compostos fenólicos são importantes componentes da matéria orgânica dissolvida e podem afetar a sua decomposição em consequência de interações com enzimas do solo interferindo na atividade enzimática (14). Uma vez que a decomposição da matéria orgânica do solo depende da ação de várias enzimas, se uma das etapas de degradação for interrompida pela ação de inibidores enzimáticos, por exemplo, toda a cascata de degradação será comprometida. Freman et al., (2001)(83) observaram que em decorrência da restrição de oxigênio no solo, houve um aumento na atividade de fenol oxidases, o que resultou na redução de compostos fenólicos solúveis e dessa maneira, a atividade de hidrolases teve um aumento seguido pelo aumento na degradação de carbono no solo.

As enzimas oxidativas apresentam papel de destaque na decomposição da matéria orgânica do solo, uma vez que estão envolvidas na etapa de despolimerização da lignina e oxidação de compostos fenólicos. São enzimas chave na produção de matéria orgânica solúvel e permitem a obtenção de substratos para as hidrolases presentes no solo (66, 67). São ainda importantes por serem capazes de degradar compostos fenólicos tóxicos presentes em agrodefensivos possibilitando a biorremediação de áreas degradadas (67).

Devido à importância dessas enzimas no solo, faz-se necessário o monitoramento de atividades agrícolas que afetem a sua atividade. Além disso o monitoramento da sua atividade ao longo do tempo reveste-se de relevância para que se possa identificar fatores que inibam ou diminuam a atividade dessas enzimas e que permitam a detecção precoce de perda de qualidade do solo em decorrência da diminuição na decomposição da matéria orgânica.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Análise de Componente Principal dos fatores físico-químicos e oxidoredutases em MO, MC e SN

A análise de componente principal (ACP) foi realizada para avaliar e identificar relações entre os fatores físico-químicos entre si e com a atividade da enzima permitindo o agrupamento de fatores que contribuem para diferenciar os diferentes solos testados.

A ACP (tabela 1) mostra os pesos das componentes principais 1 e 2 para as variáveis estudadas. O fator 1 explicou 51,2% do total da variância e as variáveis que contribuem para a construção do eixo definido pelo fator 1 são a atividade de POX e PPO, pH, Ca, Mg, H+Al, CTC, Al, M, V, Ca/Mg, Ca/K, Ca/CTC e Mg/CTC. O fator 2 explicou 11,3% do total da variância e as variáveis que contribuem para a construção desse eixo são areia, silte, argila, K e K/CTC.

Tabela 1: Descrição dos pesos das componentes principais 1 (CP1) e componentes principais 2 (CP2). Os fatores físico-químicos e atividade enzimática nos solos analisados são agrupados de acordo com o máximo de ajuste ao componente principal. (Coeficiente de correlação >0,50; n= 21)

Variáveis	Componente Principal	
	CP 1 (50.4%)	CP 2 (22,4%)
Peroxidase	0.9	0.1
Polifenoloxidase	0.6	0.4
Argila	0.38	-0.67
Silte	0.27	-0.77
Areia	-0.37	0.86
MOS	0.04	0.29
pH	-0.90	-0.38
P extraível	-0.50	0.44
K extraível	-0.65	0.66
Ca extraível	-0.95	0.001
Mg extraível	-0.86	0.27
H+Al	0.92	0.13

Al extraível	0.83	0.10
CTC	-0.90	0.21
M	0.84	0.11
V	-0.98	-0.05
Ca/Mg	-0.71	-0.30
Mg/K	-0.41	-0.54
Ca/K	-0.75	-0.57
Ca/CTC	-0.96	-0.16
Mg/CTC	-0.67	0.20
K/CTC	-0.22	0.77

Valores em negrito são estatisticamente significativos.

Analisando os dados apresentados na tabela 1, observa-se que a CP1 apresenta maior peso, ou seja, valores positivos e maiores que a média para as variáveis atividade de POX e PPO, H+Al, Al³⁺ extraível e M%. A CP2 apresenta valores positivos e maiores para as variáveis areia% e K/CTC%.

A partir da tabela 1 foi possível construir um gráfico (Figura 1A) no qual é observada a formação de três agrupamentos das variáveis analisadas. O peso das amostras dos solos coletados com relação à CP1 e CP2 também foi avaliado e é mostrado na figura 1B.

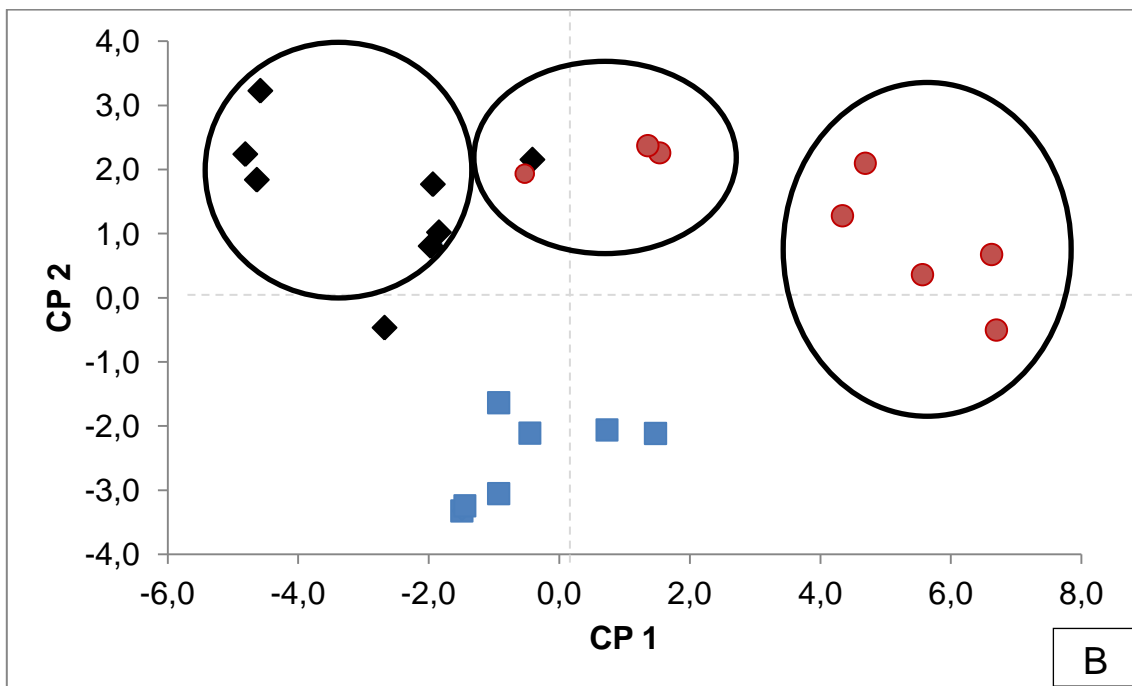
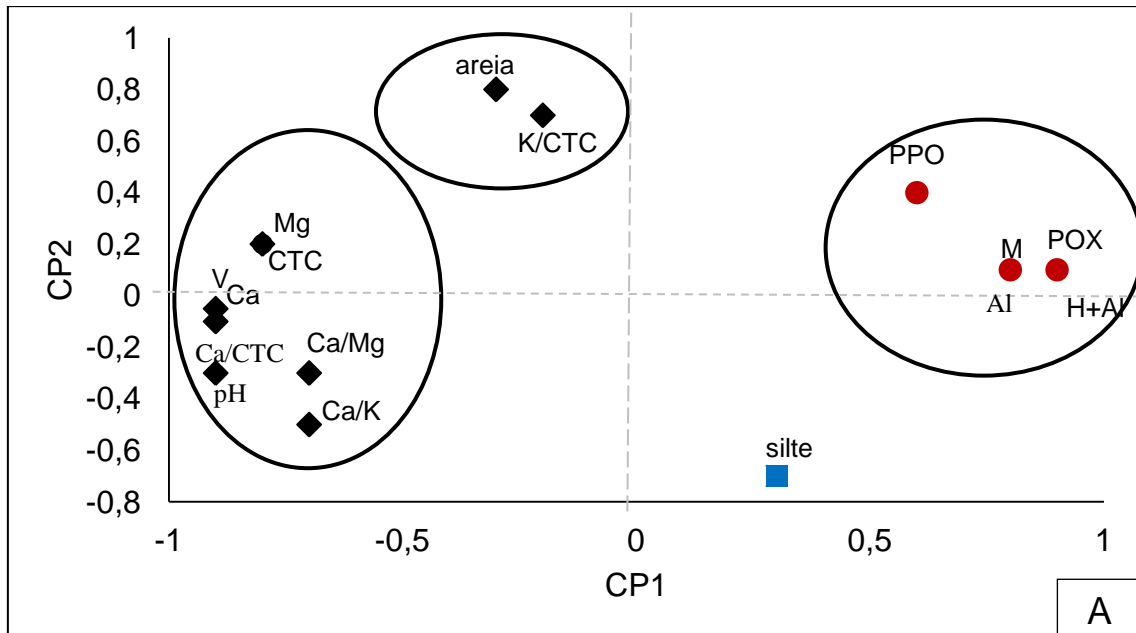


Figura 1: A) Relação entre a CP 1 *versus* CP 2 considerando os pesos de cada variável testada no solo. B) Relação entre a CP 1 *versus* CP 2 considerando os pesos das diferentes amostras do solo. Sendo que \bullet representa o SI \blacklozenge representa o MO \blacksquare representa o MC.

A partir das figuras 1A e 1B observa-se que os fatores que permitem diferenciar o SN dos solos cultivados são o Al^{3+} extraível, H+Al, M%, teor de areia, atividade de POX e PPO e K/CTC%. Já os fatores que diferenciam o solo com MO dos demais são Mg^{2+} , pH, Ca^{2+} , CTC, V, Ca/Mg, Ca/K e Ca/CTC. Por fim, a principal característica que diferencia o solo com MC dos demais é o teor de silte.

A figura 1B mostra que o solo com MO apresenta similaridade com o SN quando se considera a textura, que é representada na CP 2 pelo teor de areia e K/CTC.

A relação entre os solos demonstrada pela CP 2 explica 22% da variância dos resultados obtidos para os solos coletados. Esse resultado mostra a heterogeneidade do solo quanto à textura, que pode ser consequência possivelmente do manejo da cana-de-açúcar. Considerando-se a ACP e a quantificação da atividade da PPO e POX nos diferentes solos pode-se concluir que os fatores relacionados ao pH, tais como a quantidade de alumínio, saturação de alumínio e acidez total, são fatores importantes que interferem na atividade dessa enzima, mostrando que o pH é o fator mais relevante ao se considerar a atividade de PPO e POX no solo. É interessante notar que diferentemente das fosfomonoesterases e β -glicosidases, para as oxidoreduções estudadas a textura não foi um fator que interferiu significativamente na atividade enzimática.

De fato, a análise de correlação de Pearson mostrou que existe correlação negativa entre a atividade de POX e de PPO com o pH do solo (respectivamente $r = -0,8$ e $0,9$ $p < 0,05$). Esse resultado está de acordo com outros trabalhos descritos na literatura. Iyyemperumal e Shi (2008) (84), quantificaram enzimas em solos tratados com resíduos de suinocultura e nitrato de amônia, a peroxidase foi a enzima que mais sofreu redução de atividade em função do pH. Fuji et al., (2013) (85) também reportaram efeito limitante do pH em várias oxidoreduções em solos de floresta coletados no Japão,

Indonésia e Tailândia. Tian et al., (2010) (14), também reportaram que em seus estudos sobre a correlação da mineralização do carbono e nitrogênio com enzimas do solo as únicas enzimas que apresentaram correlação com a alteração de pH foram fenol oxidases e β -glucosaminidases.

O pH é um dos fatores mais importantes e que interfere na atividade enzimática. Podem interferir tanto o grau de ionização da enzima e dessa forma alterando sua afinidade com o substrato, quanto na produção e liberação da enzima pelos micro-organismos do solo (34, 44, 84).

A decomposição da matéria orgânica do solo se dá por meio de uma cascata de transformação que envolve desde a quebra dos polímeros de lignina oriundos de matéria orgânica de plantas vasculares e oxidação de compostos fenólicos até a decomposição da celulose originando glicose na sua etapa final.

As enzimas oxidativas atuam nas etapas iniciais da decomposição da matéria orgânica e as hidrolases, tais como as celulases, β -glicosidases e fosfatases atuam na mineralização do carbono e do fósforo respectivamente (14) e dessa forma fornecem nutrientes que poderão ser utilizados por micro-organismos, plantas e em vários processos do solo.

Uma vez que as oxidorreduções atuam nas etapas iniciais de degradação da matéria orgânica do solo, se tornam chave nesse processo, pois permitem a formação de substratos para as etapas seguintes. Dessa forma alterações no pH do solo levam à diminuição na atividade enzimática, conforme indicado pela ACP e a correlação de Pearson, comprometem a degradação da matéria orgânica, e interferem na atividade enzimática de hidrolases presentes no solo.

3.2 Efeito do manejo da cana-de-açúcar na atividade de peroxidase

Conforme observado na figura 2, o SN (353 U) apresentou maior atividade que os solos com manejo convencional (152 U) e orgânico (máximo de atividade em MO 161 U). De acordo com teste Tukey, não há diferença significativa entre as atividades de peroxidase nos manejos convencional e orgânico.

De acordo com a figura 1 o manejo provocou uma redução de 57% da atividade de peroxidase no manejo convencional e de 55% no manejo orgânico da cana-de-açúcar. O efeito do manejo de culturas em enzimas de solo já foi relatado por outros autores (17, 29, 86). No entanto, para enzimas oxidativas poucos estudos avaliando o efeito do manejo de culturas sobre essas enzimas têm sido realizados.

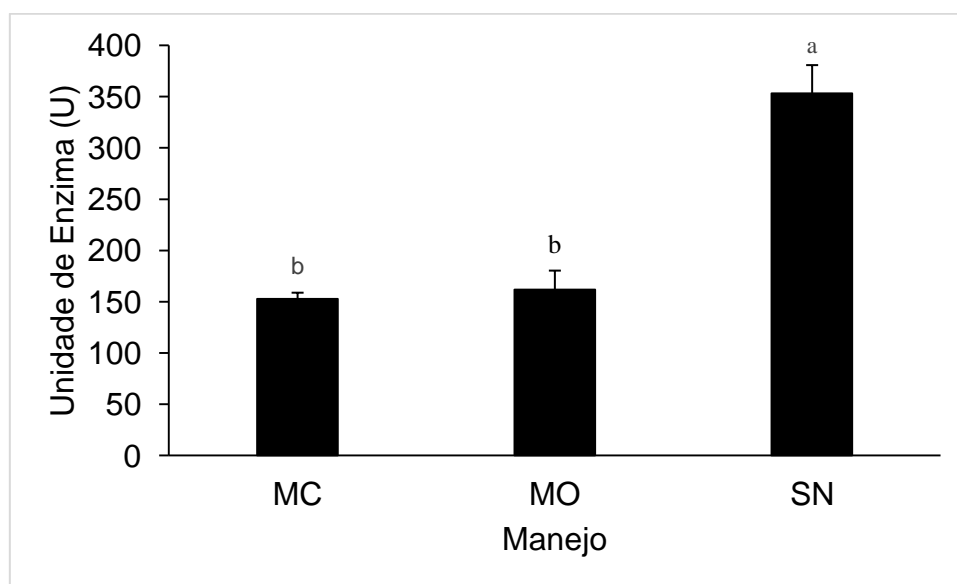


Figura 2: Efeito do manejo na atividade de peroxidase

3.3 Efeito do manejo de cana de açúcar na atividade de polifenoloxidase

O efeito do manejo de cana de açúcar na atividade de polifenoloxidase foi testado apenas no pH 6,0 de acordo com a metodologia de Halpin et. al., (1989) (72).

A figura 3 mostra o efeito do manejo orgânico e convencional na atividade de polifenoloxidase. Observa-se que o SN apresentou maior atividade enzimática (80 U) que o solo convencional (51 U) e orgânico (54 U). O teste Tukey ($p>0,05$) mostrou que não houve diferença significativa na atividade enzimática nos solos cultivados. Nesse sentido, assim como ocorreu para peroxidase, o manejo de cana de açúcar reduziu a atividade enzimática nos solos cultivados.

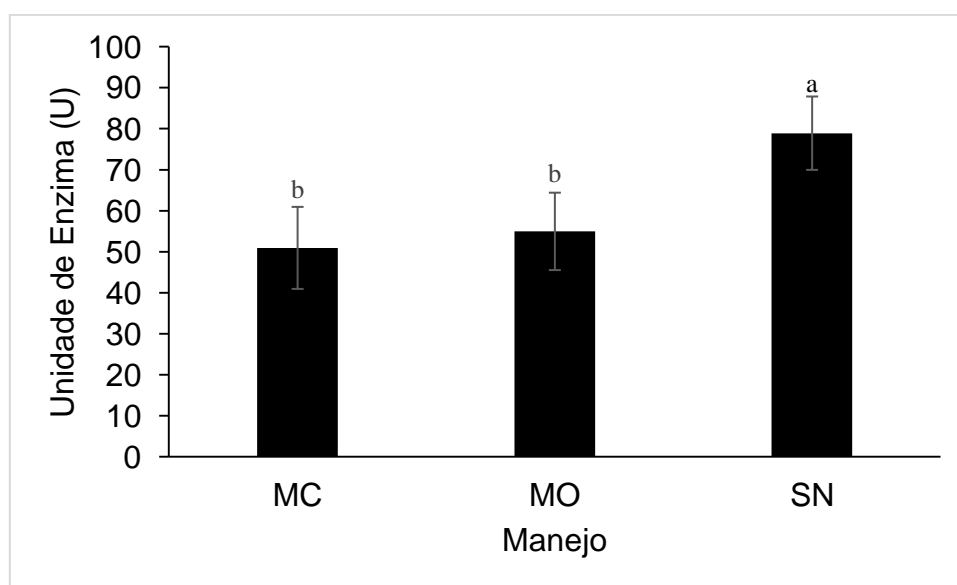


Figura 3: Atividade de polifenoloxidase nos diferentes manejos

Geng et al. (87) realizaram um estudo com várias enzimas em solo nativo de florestas e solo com retirada de vegetação e observaram que polifenoloxidases apresentaram maior atividade em solo nativo. O contrário foi observado para peroxidase, que apresentou maior atividade em solo com ação antrópica em solos de florestas de pinheiro.

Peroxidase e polifenoloxidase têm papéis importantes nas etapas iniciais de degradação da matéria orgânica que irá influenciar subsequentemente na

disponibilização de substratos para outras enzimas envolvidas na humificação, tais como a β -glicosidase. Dessa forma, torna-se importante avaliar o impacto das práticas agrícolas sobre sua atividade e uma vez que este impacto seja identificado, novas metodologias que reduzam o efeito da agricultura podem ser desenvolvidas.

4 CONCLUSÃO

A análise de componente principal dos dados de quantificação de enzimas oxidativas em solos do Cerrado (peroxidase e polifenoloxidase) e dos fatores físico-químicos permitiram diferenciar os solos coletados das áreas de SN, MO e MC. A atividade de peroxidase, polifenoloxidase, teor de alumínio, saturação de bases e acidez total foram os fatores que permitiram diferenciar NS dos solos cultivados e permitiram inferir que o pH poderia ser um dos fatores que mais afetasse a atividade dessas enzimas do solo, o que foi comprovado pela correlação de Pearson.

Foi observado ainda que o SN apresentou maior atividade de enzimas oxidativas que os manejos cultivados, mostrando que distúrbios causados pela agricultura, afetam a atividade dessas enzimas, sendo que houve redução de cerca de 36% da atividade enzimática de polifenoloxidase e 57% na atividade de peroxidase nos solos cultivados.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O manejo da cana-de-açúcar afetou de diferentes maneiras as enzimas de solo estudadas neste trabalho. Fosfomonoesterases ácidas apresentaram redução na atividade enzimática de cerca de 50% na atividade em solos sob cultivo orgânico e convencional e os fatores que mais afetaram a atividade dessa enzima foi o pH e a textura do solo. Esses fatores também afetaram a atividade de β -glucosidase, no entanto o manejo orgânico apresentou atividade enzimática similar ao do solo nativo, mostrando que esse manejo possivelmente conserva características importantes para a manutenção dessa enzima, tais como a textura e a CTC. Houve, entretanto, uma redução de cerca de 68% na atividade da β -glucosidase no manejo convencional quando comparado ao solo nativo e sob manejo orgânico. As oxidoredutases, assim com as fosfomonoesterases, apresentaram redução da sua atividade tanto no solo sob cultivo orgânico, quanto convencional, com redução de cerca de 36% da atividade enzimática. No caso dessas enzimas; o pH foi o fator que apresentou correlação com a atividade enzimática.

Cada classe de enzima estudada apresenta diferentes papéis na qualidade do solo. Portanto, a redução na atividade dessas enzimas no ambiente do solo interfere na qualidade desse ecossistema, tais como a disponibilização de glicose para micro-organismos, mineralização do carbono, fósforo e decomposição da matéria orgânica do solo. Entretanto, não foi possível afirmar conclusivamente que as enzimas testadas possam ser usadas como bioindicadores de qualidade de solos do Cerrado pois a qualidade do solo depende tanto da atividade enzimática do solo quanto de sua relação com outros fatores tanto químicos quanto biológicos no solo pois um solo com alta atividade enzimática pode apresentar baixa diversidade de micro-organismos e assim não garante a qualidade desse ecossistema.

Dessa forma, considerando os resultados obtidos, o conhecimento acerca dos fatores que interferem na atividade dessas enzimas é importante pois permite além da detecção precoce de alterações na função do solo, que novas tecnologias de manejo sustentável possam ser desenvolvidas.

6 PERSPECTIVAS

Este trabalho de pesquisa trouxe respostas, mas também novos questionamentos permitem a continuidade de uma linha de pesquisa em bioquímica do solo, tais como:

- Ampliação de testes bioquímicos envolvendo enzimas oxidativas;
- Estudo de outras enzimas envolvidas na função e qualidade do solo, tais como urease, protease, amidase;
- Extração e caracterização das enzimas imobilizadas nas partículas do solo;
- Correlação entre a comunidade microbiana e a atividade enzimática nos solos sob cultivo orgânico e convencional da cana-de-açúcar;
- Efeito da aplicação da vinhaça na atividade das enzimas presentes no solo do Cerrado;
- Avaliar as enzimas em diferentes situações de estresse devido a diferenças sazonais;
- Contribuir para o desenvolvimento de políticas públicas para a expansão da cultura de cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. EMBRAPA, *Sistema Brasileiro de Classificação de Solos*. 2o ed.; Rio de Janeiro - RJ, 2006; p 306.
2. Hungria, M., Vargas, M.A.T., Campo, R. ., . p. *A inoculação da soja*, (Embrapa-CNPSo. *Circular Técnica*, 17; Embrapa-CPAC. *Circular Técnica*, 34); Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária: Londrina, 1997b; p 28.
3. MMA, Programa Cerrado Sustentável. In Ambiente, M. d. M., Ed. Ministério do Meio Ambiente: Brasília, 2003; p 56.
4. Klink, C. A., Machado, R.B. , Conservation of the Brazilian Cerrado. *Conservation Biology* **2005**, *19*, 707 - 713.
5. Carvalho, J. L. N., Raucci, G.S., Frazão, L.A., Cerri, C.E.P., Bernouxd, M., Cerri, C.C. , Crop-pasture rotation: A strategy to reduce soil greenhouse gasemissions in the Brazilian Cerrado. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **2014**, *183*, 167– 175.
6. Gauder, M., Graeff-Honninger, S., Claupein, M., The impact of a growing bioethanol industry on food production in Brazil. *Applied Energy* **2011**, *88*, 672-679.
7. Furtado, A. T., Scandiffio, M.I.G., Cortez, L.A.B. , The Brazilian sugarcane innovation system. *Energy Policy* **2011**, *39*, 156 - 166.
8. Maia, S. M. F., Ogle, S.M., Cerri, C.C., Cerri, C.E.P., Changes in soil organic carbon storage under different agricultural management systems in the Southwest Amazon Region of Brazil. *Soil & Tillage Research* **2010**, *106*, 177-184.
9. Armas, E. D., Monteiro, R.T.S. , Uso de agrotóxicos em cana-de-açúcar na bacia do rio Corumbáiba e o risco de poluição hídrica. *Química Nova* **2005**, *28*, 975-982.
10. Spadaro.; Gullino, M. L., Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. *Crop Protection* **2005**, *24*, 601-613.
11. Ritz, K., Black, H.I.J., Campbell, C.D., Harris, J.A, Claire W., Selecting biological indicators for monitoring soils: A framework for balancing scientific and technical opinion to assist policy development. *Ecological Indicators* **2009**, *9*, 1212-1213.
12. Martinez, C., Hancock, G.R., Kalma, J.D. , Relationships between 137Cs and soil organic carbon (SOC) in cultivated and never-cultivated soils: An Australian example. *Geoderma* **2010**, *158*, 137 - 147.
13. Trasar-Cepeda, C., Leirós, M.C., Seoane, S., Gil-Sotres, F. , Biochemical properties of soils under crop rotation. *Applied Soil Ecology* **2008**, *39*, 133-143.
14. Tian, L., Dell, E., Shi, W. , Chemical composition of dissolved organic matter in agroecosystems: Correlations with soil enzyme activity and carbon and nitrogen mineralization. *Applied Soil Ecology* **2010**, *46*, 426-435.
15. Zhang, A., Chen, Z., Zhang, G. , Chen, L., Wu, Z., Soil phosphorus composition determined by ³¹P NMR spectroscopy and relative phosphatase activities influenced by land use. *European Journal of Soil Biology* **2012**, *52*, 73-77.
16. K.Wei, Z. H. C., X.P. Zhang, W.J. Liang, L.J. Chen, Tillage effects on phosphorus composition and phosphatase activities in soil aggregates. *Geoderma* **2014**, *217–218*, 37–44.
17. Moscatelli, M. C., Lagomarsino, A., Garzillo, A.M.V., Pignataro, A., Grego, S. , Beta-glucosidase kinetic parameters as indicators of soil quality under conventional and organic cropping systems applying two analytical approaches. *Ecological Indicators* **2012**, *13*, 322–327.
18. Pinzari, F., Trinchera, A., Benedetti, A., Sequi, P., Use of biochemical indices in the mediterranean environment: comparison among soils under different forest vegetation. *Journal of Microbiological Methods* **1999**, *36*, 21-28.
19. MAPA Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento. <http://www.agricultura.gov.br/> (18/02/2014),
20. Jadoski, C. J., Toppa, B.E.V., 2, Julianetti, A., Hulshof, T., Ono, E.O. , Rodrigues, J.D., Fisiologia do desenvolvimento do estágio vegetativo da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). *Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia* **2010**, *3*, 169-178.

21. IBGE, Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. In December, 2013 ed.; Rio de Janeiro, RJ, 2013; Vol. 26, p 84.
22. MME Ministério de Minas e Energia. <http://www.mme.gov.br/mme> (18/02/2014),
23. Agency, I. E., World Energy Outlook. In 2013.
24. Garside, A. L., Bell, M.J., Cunningham, G., Berthlesen, J., Halpin, N.V., Rotation and fumigation effects on the growth and yield of sugarcane. *Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technology* **1999**, *21*, 69–78.
25. Pankhurst, C. E., Blair, B.L., Magarey, R.C., Stirling, G.R., Bell, M.J. , Garside, A.L Effect of rotation breaks and organic matter amendments on the capacity of soils to develop biological suppression towards soil organisms associated with yield decline of sugarcane. *Applied Soil Ecology* **2005**, *28* 271–282.
26. Pankhurst, C. E., Magarey, R.C., Stirling, G.R., Blair, B.L., Bell, M.J., Garside, A.L., Management practices to improve soil health and reduce the effects of detrimental soil biota associated with yield decline of sugarcane in Queensland. *Australian Soil and Tillage Research* **2003**, *72*, 125–137.
27. Peres, J. G., Souza, C.F., Lavorenti, N.A. , Avaliação dos efeitos da cobertura da palha de cana-de-açúcar na umidade e na perda de água do solo. *Engenharia Agrícola* **2010**, *30*, 875-886.
28. Souza, H. A., Marcelo, A.V., Centurion, J.F. , Carbono orgânico e agregação de um latossolo vermelho com colheita mecanizada de cana-de-açúcar. *Revista Ciência Agronômica* **2012**, *43*, 658-663.
29. García-Ruíz, R., Ochoa, V., Vinegla, B., Hinojosa, M.B. , Pena-Santiago, R. , Liébanas, G. , Linares, J.C., Carreira, J.A. , Soil enzymes, nematode community and selected physico-chemical properties as soil quality indicators in organic and conventional olive oil farming: Influence of seasonality and site features *Applied Soil Ecology* **2009**, *41*, 305–314.
30. Roberto García-Ruiz, V. O., M. Belén Hinojosa, Jose Antonio Carreira, Suitability of enzyme activities for the monitoring of soil quality improvement in organic agricultural systems. *Soil Biology & Biochemistry* **2008**, *40*, 2137–2145.
31. Mazzoncini, M., Canali, S., Giovannetti, M., Castagnolli, M., Tittarelli, F., Antichi, D., Nannelli, R., Cristani, C., P. Bàrberi, Comparison of organic and conventional stockless arable systems: A multidisciplinary approach to soil quality evaluation. *Applied Soil Ecology* **2010**, *44*, 124 - 134.
32. Snapp, S. S., Gentry, L.E., Harwood, R., Management intensity – not biodiversity – the driver of ecosystem services in a long-term row crop experiment. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **2010**, *158*, 242-248.
33. Naiak, D. R., Jagadeesh Babu, Y., Adhya, T.K., Long-term application of compost influences microbial biomass and enzyme activities in a tropical Aeris Endoaquept planted to rice under flooded condition. *Soil Biology & Biochemistry* **2007**, *39*.
34. Dick, R. P., Kandeler, E., Enzymes In Soils. In *Encyclopedia of Soils in the Environment*, Hillel, D., Ed. Oxford, 2005; pp 448 - 455.
35. Ajwa, H. A., Dell, C.J., Rice, C.W. , Changes in enzyme activities and microbial biomass of tallgrass prairie soil as related to burning and nitrogen fertilization. *Soil Biology and Biochemistry* **1999**, *31*, 769 - 777.
36. Torsvik, V., Ovreas, L. , Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* **2002**, *5*, 240-245.
37. Saiya-Cork, D. R., Sinsabaugh, R.L., Zak, D.R. , The effects of long term nitrogen deposition on extracellular enzyme activity in an Acer saccharum forest soil. *Soil Biology and Biochemistry* **2002**, *34*, 1309-1315.
38. Ros, M., Pascual, J.A., Garcia, C., Hernandez, M.T., Hydrolase activities, microbial biomass and bacterial community in a soil after long-term amendment with different composts. *Soil Biology & Biochemistry* **2006**, *38*, 3443-3452.
39. Bandick, A. K., Dick, R.P., Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biology and Biochemistry* **1999**, *31*, 1471-1479.
40. Sarkar, J. M., Leonovicz, A., Immobilization of Enzymes on Clays and Soils. *Soil Biology & Biochemistry* **1989**, *21*, 223-230.

41. Gianfreda, L., Rao, M.A., Sannino, F., Saccomandi, F., Violante, A., Enzymes in Soil: Properties, Behavior and Potential Applications. *Developments in Soil Science* **2002**, 28 B, 301 - 327.
42. Schmidt G, L. M. S., Phosphatase ester cleavage (survey). In *The enzymes*, PD., B.; Lardy H; K, M., Eds. Academic: New York, 1961; pp 3–35.
43. Nannipieri, P., Giagnoni, L., Landi, L., Renella, G., Role of Phosphatase Enzymes in Soil. In *Phosphorus in Action, Soil Biology*, al., E. K. B. e., Ed. 2011; Vol. 26, pp 215-243.
44. Eivazi, F., Tabatabai, M.A., Phosphatases in soils. *Soil Biology and Biochemistry* **1977**, 9, 167–172.
45. Cosgrove, D. J., *Inositol phosphates. Their chemistry, biochemistry and physiology*. Elsevier: Amsterdam, 1980.
46. Dick, W. A., Tabatabai, M.A., Inorganic pyrophosphatase activity of soil. *Soil Biology & Biochemistry* **1978**, 10, 59-65.
47. Acosta-Martínez, V., Tabatabai, M.A., Enzyme activities in a limed agricultural soil. *Biology and Fertility of Soils* **2000**, 31, 85–91.
48. Yadav, R. S., Tarafdar, J.C., Phytase of fungi in arid and semi-arid soils and their efficiency in hydrolysing different organic P compounds. *Soil Biology & Biochemistry* **2003**, 35, 1-7.
49. Melo, W. J., Melo, G.M.P., Araújo, A.S.F., Melo, V.P., Avaliação da atividade enzimática em amostras de solo. In *Biotecnologia aplicada à agricultura. Textos de apoio e protocolos experimentais*, 1 ed.; Márcia do Vale Barreto Figueiredo, H. A. B., José de Paula Oliveira, Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos, Newton Pereira Stamford, Ed. EMBRAPA: Brasília, DF; Pernambuco, PE, 2010; pp 153-187.
50. Benjamin L. Turner, B. M., J. Engelbrecht, Soil organic phosphorus in lowland tropical rain forests. *Biogeochemistry* **2011**, 103, 297–315.
51. Kedi, B., Abadie, J., Sei, J., Quiquampoix, H., Staunton, S., Diversity of adsorption affinity and catalytic activity of fungal phosphatases adsorbed on some tropical soils. *Soil Biology & Biochemistry* **2012**, 1-8.
52. Blake, R. E., O'Neil J.R.O., Surkov, A.V., Biogeochemical cycling of phosphorus: insights from oxygen isotope effects of phosphoenzymes. *American Journal of Science* **2005**, 305, 596–620.
53. Hansson, T., Ablerecreutz, P., Enzymatic synthesis of hexyl glycosides from lactose at lowwater activity and high temperature using hyperthermostables b-glucosidases. *Biocatalysis and Biotransformation* **2002**, 220, 167–178.
54. Shewale, J. G., Beta glucosidase: its role in cellulase synthesis and hydrolysis of cellulose. *International Journal of Biochemistry* **1982**, 14, 435–443.
55. Singhanian, R. R., Patel, A.K., Sukumaran, R.K., Larroche, C., Pandey, A., Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology* **2013**, 127, 500–507.
56. Eivazi, F., Tabatabai, M.A., Glucosidases and Galactosidases in Soils. *Soil Biology & Biochemistry* **1988**, 20, 601-606.
57. Landgraf, D., Klose, S., Mobile and readily available C and N fractions and their relationship to microbial biomass and selected enzyme activities in a sandy soil under different management systems. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **2002**, 165, 9-16.
58. Gong, C. S., Ladisch, M.R., Tsao, G.T., Cellobiase from *Trichoderma viride*: purification, properties, kinetics, and mechanism. *Biotechnology and Bioengineering* **1977**, 19, 959–981.
59. Bhatia, Y., Mishra, S., Bisaria, V.S., 2002. *Critical Reviews in Biotechnology* **Microbial beta-glucosidases: cloning, properties and applications**, 22, 375–407.
60. Henrissat, B., Bairoch, A., Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochemical Journal* **1996**, 316, 695–696.
61. Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J.C., van Dijck, P.W.M., On the safety of *Aspergillus niger*: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2002**, 59, 426-435.

62. Sinsabaugh, R. L., Moorhead, D.L. , Resource allocation to extracellular enzyme production: A model for nitrogen and phosphorus control of litter decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* **1994**, *26*, 1305–1311.
63. Gil-Sotres, F., Trasar-Cepeda, C., Leiros, M.C., Seoane, S. , Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biology & Biochemistry* **2005**, *37*, 177 - 187.
64. Knight, T. R., Dick, R.P. , Differentiating microbial and stabilized β -glucosidase activity relative to soil quality. *Soil Biology & Biochemistry* **2004**, *36*, 2089-2096.
65. Kuznyakov, Y., Priming effects: Interactions between living and dead organic matter. *Soil Biology & Biochemistry* **2010**, *42*, 1363-1371.
66. Sinsabaugh, R. L., Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. *Soil Biology and Biochemistry* **2010**, *42*, 391-404.
67. Durán, N., E. Esposito, Lignin biodegradation and effluent treatment by ligninolytic fungi. In I.S. De Melo, J. L. A., Ed. Microbiologia Ambiental, CNPMA/EMBRAPA: São Paulo, 1997; p 269.
68. Bollag, J. M., Chen, C.M., Sarkar, J.M., Loll, M.J. , Extration and Purification of a peroxidase from soil. *Soil Biology & Biochemistry* **1987**, *19*, 61-67.
69. Johnsen, A. R., Jacobsen, O.S. , A quick and sensitive method for the quantification of peroxidase activity of organic surface soil from forests. *Soil Biology & Biochemistry* **2008**, *40*, 814–821.
70. Baldrian, P., Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* **2006**, *30*, 215-242.
71. Karam, J., Nicell, J.A. , Potential applications of enzymes in waste treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **1997**, *69*, 141.
72. Halpin, B., Pressey, R., Jen, J.J., Mody, N., Purification and characterization of peroxidase from green peas. *Journal of Food Science* **1989**, *54*, 644-649.
73. Halpin, B. E., Lee, C.Y., Effect of blanching on enzyme activity and quality changes in green peas. *Journal of Food Science* **1987**, *52*, 1002-1005.
74. Dinesh, R., Srinivasan, V., Hamza, S., Parthasarathy, V.A., Aipe, K.C. , Physico-chemical, biochemical and microbial properties of the rhizospheric soils of tree species used as supports for black pepper cultivation in the humid tropics. *Geoderma* **2010**, *158*, 252-258.
75. Flury, B., Riedwyl, H., *Multivariate statistics. A practical approach*. London, 1988.
76. IBGE Levantamento mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. www.ibge.gov.br (17/03/2013),
77. Pettit, N. M., Lindsay J., Gregory, R.B. Freedman, Burns, R.G. , Differential Stabilities of Soil Enzymes Assay and Properties of Phosphatase and Arylsulphatase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1977**, *485*, 357 – 366.
78. Nannipieri, P., Characterization of humus-phosphatase complexes extracted from soil. *Soil Biology & Biochemistry* **1988**, *20*, 683 – 691.
79. L.L.A. Purcena, S. S. C., S. Mitidieri, K.F. Fernandes, The immobilization of trypsin onto polyaniline for protein digestion. *Materials Science and Engineering C* **2009**, *29*, 1077–1081.
80. S.S. Caramori, K. F. F., The use of poly(ethylene terephthalate)-poly(aniline) composite for trypsin immobilisation. *Materials Science and Engineering C* **2008**, *28*, 1159-1163.
81. Silva, R. N., Asquiere, E.R. , Fernandes, K.F., Immobilization of *Aspergillus niger* glucoamylase onto a polyaniline polymer. *Process Biochemistry* **2005**, *40*, 1155-1159.
82. Fernandes, K. F., Lima, C.S., Lopes, F.M., Collins, C.H., Properties of horseradish peroxidase immobilised onto polyaniline. *Process Biochemistry* **2004**, *39*, 957-962.
83. Freeman, C., Ostle, N., Kang, H., . . ; 409, An enzymic ‘latch’ on a global carbon store. *Nature* **2001**, *409*.
84. Iyyemperumal, K., Shi, W., Soil enzyme activities in two forage systems following application of different rates of swine lagoon effluent or ammonium nitrate. *Applied Soil Ecology* **2008**, *38*, 128-136.

85. Fujii, K., Uemura, M., Hayakawa, C., Funakawa, S., Kosaki, T., Environmental control of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase activities in forest floor layers in humid Asia. *Soil Biology & Biochemistry* **2013**, *57*, 109-115.
86. Balota, E. L., Machineski, O., Truber, P.V., Auler, P.A.M. , Effect of Tillage Systems and Permanent Groundcover Intercropped with Orange Trees on Soil Enzyme Activities. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **2011**, *54*, 221-228.
87. Geng, Y., Dighton, J., Gray, D. , The effects of thinning and soil disturbance on enzyme activities under pitch pine soil in New Jersey Pinelands. *Applied Soil Ecology* **2012**, *62*, 1-7.